

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
15 juillet 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/058815 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07K 14/435, C12Q 1/68,  
C12N 15/63, C07K 16/18, G01N 33/50, A01K 67/027,  
A61K 48/00, 38/00, 39/00, C12N 15/12

Résidence Parc d'Alco, Appt 125, F-34080 Montpellier (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/003895

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36 rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :  
24 décembre 2003 (24.12.2003)

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Langue de publication : français

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

(30) Données relatives à la priorité :  
02/16648 24 décembre 2002 (24.12.2002) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel-Ange, F-75794 Cedex 16 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GIORGI, Dominique [FR/FR]; 391 rue du Mas du Juge, F-34980 Saint Gely du Fesc (FR). ROUQUIER, Sylvie [FR/FR]; 391 rue du Mas du Juge, F-34980 Saint Gely du Fesc (FR). SAFFIN, Jean-Michel [FR/FR]; 59 rue Michel Teule,

WO 2004/058815 A2

(54) Title: NOVEL CENTROSOME-ASSOCIATED PROTEIN AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX CENTROSOMES ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a novel centrosome-associated protein, to the polynucleotide coding for the aforementioned protein and to the applications of said protein and polynucleotide. The overexpression of the inventive protein disrupts the mitotic spindle assembly and leads to aberrant and abortive mitoses.

(57) Abrégé : L'invention est relative une nouvelle protéine associée aux centrosomes, au polynucléotide codant pour ladite protéine ainsi qu'aux applications de ladite protéine et dudit polynucléotide. La surexpression de la protéine selon l'invention entraîne des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX CENTROSOMES ET SES APPLICATIONS.

La présente Invention est relative à une nouvelle protéine associée aux centrosomes, au polynucléotide codant pour ladite protéine ainsi 5 qu'aux applications de ladite protéine et dudit polynucléotide.

Le processus de division cellulaire consiste en une division nucléaire (mitose) suivie d'une division cytoplasmique (cytokinèse). La mitose est dominée par la formation d'un fuseau polaire très organisé (le fuseau mitotique) constitué de deux familles de microtubules : les microtubules 10 polaires et les microtubules kinétochoriens. Les microtubules sont des polymères composés de sous-unités d' $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline. Leur croissance est initiée dans la région périphérique du centrosome par un complexe contenant majoritairement une protéine apparentée, la  $\gamma$ -tubuline. Les microtubules polaires sont composés de rangées de microtubules et de protéines associées qui 15 sont mises en place par les deux centres mitotiques, associés à des centrioles, situés aux pôles opposés du fuseau (asters). Chaque chromosome répliqué est constitué de deux chromatides sœurs reliées entre elles par le centromère. Les microtubules kinétochoriens sont liés aux chromosomes répliqués par des structures spécialisées appelées kinétochores qui se 20 forment au cours de la prophase sur chacune des deux faces du centromère. Les chromosomes se condensent pendant la prophase et forment les microtubules kinétochoriens qui commencent à interagir avec les microtubules polaires du fuseau après rupture de l'enveloppe nucléaire au cours de la prométaphase. Sous l'effet de la tension due aux forces opposées, dirigées 25 vers les pôles qui tirent les microtubules kinétochoriens, les chromosomes s'alignent dans la zone équatoriale du fuseau pendant la métaphase. A l'anaphase, sous l'effet de forces continuellement développées au sein du fuseau mitotique, les chromatides sœurs se détachent et sont attirées vers les pôles opposés. Dans le même temps, les deux pôles cellulaires s'écartent. Au cours 30 de la télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme à la surface de chaque groupe de chromosomes.

La division cellulaire s'achève au moment où le contenu cytoplasmique est divisé selon le processus de cytokinèse. Le fuseau mitotique joue un rôle important dans le processus de cytokinèse, en fixant la mise en place de la segmentation cellulaire. Le sillon de division apparaît invariablement dans le plan de la plaque équatoriale, perpendiculairement à l'axe du fuseau mitotique.

Les processus décrits ci-dessus sont finement régulés par un équilibre entre des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation. Lorsque la cellule entre en mitose, des changements importants dans la phosphorylation des protéines interviennent. Le centrosome et le fuseau mitotique sont particulièrement enrichis en sites phosphorylés. De nombreuses protéine-kinases, particulièrement des sérine-thréonine-kinases, ont été décrites comme intervenant dans ces processus de phosphorylation (voir à cet égard Giet R. et Prigent C., *J. Cell Science*, 112, 3591-3601, 1999).  
15 Parmi celles-ci on citera celles localisées au niveau des centrosomes, parmi lesquelles les kinases de type aurora, requises pour la séparation des centrosomes et l'assemblage du fuseau mitotique, les kinases de type polo, impliquées dans la maturation et la formation du fuseau bipolaire et les kinases de type NIMA qui régulent la séparation des centrosomes.

20 Les mammifères possèdent au moins trois protéine-kinases du type aurora. Chez l'homme, ces trois protéine-kinases sont surexprimées dans des pathologies cancéreuses du fait d'anomalies chromosomiques. Ainsi, ces protéines semblent jouer un rôle important dans le contrôle de la ploïdie. Par exemple, une inactivation ou une surexpression de deux de ces 25 kinases conduit à une polyploïdie. L'inhibition de l'activité de la kinase aurora A conduit à la formation de fuseaux monopolaires. L'inhibition de l'activité de la kinase aurora B conduit à la formation de cellules multinucléées par défaut de cytokinèse. Ces anomalies chromosomiques apparaissent liées à des perturbations dans la formation du fuseau mitotique.

30 Les partenaires et les substrats de ces protéine-kinases sont encore peu connus. Par exemple, chez le xénope, aurora A interagit avec une kinésine impliquée dans la dynamique des microtubules. Chez l'homme, elle

phosphoryle la protéine HsTACC-3, également surexprimée dans de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. Chez la drosophile, aurora A phosphoryle la protéine D-TACC et est nécessaire à sa localisation aux centrosomes afin de réguler les microtubules astraux. D-TACC interagit avec 5 la protéine associée aux microtubules (MAP : Microtubule Associated Protein) Msp, qui fait partie de la famille des protéines XMAO215/ch-TOC/Msp, qui stimulent la croissance des microtubules *in vitro* et sont concentrées au niveau des centrosomes *in vivo*. D-TACC et Msp coopèrent pour stabiliser les centrosomes. Le terme MAP regroupe une collection de protéines variées 10 définies sur la base de leur capacité à interagir avec les microtubules. Les MAP apparaissent comme des partenaires/substrats des kinases du centrosome comme aurora ou polo.

Une division cellulaire correcte nécessite une coordination entre la ségrégation des chromosomes par le fuseau mitotique et le clivage de 15 la cellule par l'appareil de cytokinèse. Les microtubules du fuseau mitotique jouent un rôle essentiel dans les deux processus.

Cependant, malgré l'ensemble des travaux réalisés sur la division cellulaire, les facteurs intervenant dans une mise en place correcte du fuseau mitotique et/ou au contraire perturbant sa mise en place et/ou sa 20 structure, entraînant ainsi les conséquences ci-dessus décrites ne sont toujours pas connus.

Une telle connaissance permettrait d'une part de mieux comprendre les mécanismes de la mitose et d'autre part de pouvoir développer des moyens de lutter contre les anomalies de la division cellulaire et les 25 conséquences qu'elles entraînent.

C'est dans ce domaine que se place la présente Invention.

En effet, de manière surprenante et inattendue, les Inventeurs ont mis en évidence une nouvelle protéine humaine associée aux centrosomes. Par immunofluorescence, elle est détectée en colocalisation avec l'α-tubuline des microtubules du fuseau mitotique, en particulier avec l'aster. 30 Cette protéine a été nommée ASAP pour Aster Associated Protein (Protéine Associée à l'Aster) par les Inventeurs.

La surexpression de la protéine selon l'Invention entraîne des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires). Sa surexpression bloque la division cellulaire et par conséquent la 5 prolifération cellulaire.

Ainsi, l'Invention a pour objet une protéine isolée, dénommée ASAP, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

- a) une protéine répondant à la séquence représentée dans la 10 liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1 ;
- b) une protéine présentant, sur la totalité de sa séquence, au moins 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou au moins 95% de similarité, avec la protéine de SEQ ID NO: 1.

15 Une protéine conforme à l'Invention se caractérise par les propriétés suivantes :

- elle présente un poids moléculaire compris entre 60 et 100 kDa, de préférence entre 65 et 80 kDa ;
- elle est associée aux centrosomes ;
- elle est colocalisée par immunofluorescence avec l'α-tubuline des microtubules du fuseau mitotique ;
- elle présente une faible identité (23%) avec la protéine MAP1A (Microtubule Associated Protein 1A) ;
- elle présente des domaines coiled-coil essentiellement regroupés dans sa partie C-terminale entre les acides aminés 297 et 327 d'une part et 477 et 628 d'autre part, indiquant soit que la protéine s'oligomérise, soit qu'elle interagit avec d'autres protéines ;
- elle présente une faible identité (20%), entre les acides aminés 300 et 600 avec un domaine de type caldesmon (Gusev, N.B., 30 Biochemistry, 10 : 1112-1121, 2000), référencé pfam00769 (NCBI, domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrvcgi?uid=pfam00769>), et, entre les acides aminés 480 et 630, avec un domaine de type ERM

(Ezrin/radixin/moesin ; Louvet-Vallet, S., Biol. Cell, 274 : 305-316, 2000), référencé pfam02029 (NCBI, domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrvcgi?uid=pfam02029>). Les protéines caldesmon et ERM sont également considérées comme des MAP ;

5           - elle présente également, entre les positions 65 et 303, un domaine BRCT, (Breast cancer carboxy-terminal domain ; Bork, P., et coll., FASEB J., 11, 68-76 (1997)), indiquant que la protéine est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire ;

10           - elle présente une grande richesse en hélices  $\alpha$  dans sa partie C-terminale, en particulier dans la région comprise entre les acides aminés 420-620, presque exclusivement formée d'hélices  $\alpha$ .

Ces éléments permettent de penser que la protéine ASAP est une nouvelle MAP.

15           Les protéines selon l'Invention incluent toute protéine (naturelle, synthétique, semi-synthétique ou recombinante) de n'importe quel organisme procaryote ou eucaryote, notamment d'un mammifère, comprenant ou consistant en une protéine ASAP. Préférentiellement, ladite protéine est une protéine ASAP fonctionnelle.

20           On entend par "fonctionnelle", une protéine possédant une activité biologique normale, c'est à dire capable d'intervenir dans l'organisation du fuseau mitotique et dans la division cellulaire. Cette protéine peut comprendre des mutations silencieuses n'induisant aucun changement substantiel dans son activité et ne produisant aucune modification phénotypique.

25           Des protéines conformes à l'invention sont notamment représentées par les protéines ASAP humaine (SEQ ID NO : 1) et murine (SEQ ID NO : 46).

30           Sont incluses dans les protéines selon l'Invention définies en b), les protéines variantes des séquences SEQ ID NO: 1 et 46, en particulier les protéines dont la séquence en acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, une délétion, une substitution et/ou une addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport

aux séquences SEQ ID NO: 1 et 46.

De manière préférée, les protéines variantes présentent une mutation entraînant un dysfonctionnement (activation ou inhibition) de la protéine, d'autres gènes ou protéines ou encore de la cellule en général.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'Invention, ladite protéine est une protéine de mammifère, préférentiellement une protéine d'origine humaine.

Au sens de la présente Invention les définitions suivantes s'appliquent.

10 L'identité d'une séquence par rapport à la séquence de SEQ ID NO :1 comme séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques, lorsque les deux séquences sont alignées, de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

15 Le pourcentage d'identité peut être calculé par l'Homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquences tel que, par exemple celui de la suite BLAST (Altschul et al., NAR, 1997, 25, 3389-3402).

20 Les programmes BLAST sont mis en œuvre sur la fenêtre de comparaison constituée par la totalité de la SEQ ID NO :1, indiquée comme séquence de référence.

25 Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % d'identité avec une séquence de référence est définie, dans la présente Invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations pour 100 acides aminés de la séquence de référence, tout en conservant les propriétés fonctionnelles de ladite protéine de référence. Au sens de la présente Invention, le terme altération inclut les délétions, les substitutions ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

30 La similarité d'une séquence par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques ou qui diffèrent par des substitutions conservatives,

lorsque les deux séquences sont alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles. Au sens de la présente Invention, on entend par substitution conservative, la substitution d'un acide aminé par un autre qui présente des propriétés chimiques ou physiques similaires (taille, charge ou 5 polarité), qui généralement ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de la protéine.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % de similarité avec une séquence de référence est définie, dans la présente Invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 10 100-X altérations non-conservatives pour 100 acides aminés de la séquence de référence. Au sens de la présente Invention, le terme altérations non-conservatives inclut les délétions, les substitutions non-conservatives ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

15 Par "techniques ou méthodes bien connues de l'homme du métier" on entend ici se référer aux techniques ou méthodes classiquement utilisées par l'homme du métier et exposées dans de nombreux ouvrages, comme en particulier celui intitulé Molecular Cloning. A Laboratory Manual (Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press).

20 La protéine selon l'Invention est obtenue soit à partir d'une cellule, soit par synthèse chimique, soit par recombinaison génétique.

Par synthèse chimique, la protéine peut être obtenue en utilisant l'une des nombreuses voies de synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides ou des 25 techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Dans ce cas, la séquence de la protéine peut être modifiée afin d'améliorer sa solubilité, en particulier dans les solvants aqueux. De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la 30 substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

La protéine selon l'Invention est constituée de l'enchaînement de 13 peptides correspondants aux produits de traduction de 13 des 14 exons

que comporte le gène correspondant, le premier exon n'étant pas traduit (voir ci-après).

De manière plus précise, lesdits peptides répondent aux séquences suivantes (positions données par rapport à la numérotation de la 5 séquence SEQ ID NO: 1) :

- Peptide 1 : il comprend 25 acides aminés correspondants aux positions 1 à 25 (SEQ ID NO: 2) ;

- Peptide 2 : il comprend 28 acides aminés correspondants aux positions 26 à 53 (SEQ ID NO: 3) ;

10 - Peptide 3 : il comprend 107 acides aminés correspondants aux positions 54 à 160 (SEQ ID NO: 4) ;

- Peptide 4 : il comprend 76 acides aminés correspondants aux positions 161 à 236 (SEQ ID NO: 5) ;

15 - Peptide 5 : il comprend 31 acides aminés correspondants aux positions 237 à 267 (SEQ ID NO: 6) ;

- Peptide 6 : il comprend 83 acides aminés correspondants aux positions 268 à 350 (SEQ ID NO: 7) ;

- Peptide 7 : il comprend 24 acides aminés correspondants aux positions 351 à 374 (SEQ ID NO: 8) ;

20 - Peptide 8 : il comprend 54 acides aminés correspondants aux positions 375 à 428 (SEQ ID NO: 9) ;

- Peptide 9 : il comprend 32 acides aminés correspondants aux positions 429 à 460 (SEQ ID NO: 10) ;

25 - Peptide 10 : il comprend 54 acides aminés correspondants aux positions 461 à 514 (SEQ ID NO: 11) ;

- Peptide 11 : il comprend 49 acides aminés correspondants aux positions 515 à 563 (SEQ ID NO: 12) ;

- Peptide 12 : il comprend 43 acides aminés correspondants aux positions 564 à 606 (SEQ ID NO: 13) ;

30 - Peptide 13 : il comprend 41 acides aminés correspondants aux positions 607 à 647 (SEQ ID NO: 14).

La présente Invention a aussi pour objet un peptide constitué d'un fragment d'au moins 10 acides aminés consécutifs d'une protéine définie ci-dessus en a) ou b), particulièrement un peptide sélectionné parmi :

5 - les séquences correspondant aux peptides 1 à 13 décrits ci-dessus, c'est-à-dire sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO: 2 à SEQ ID NO: 14, et

10 - les séquences SEQ ID NO : 47 à 53 correspondant à des mutants de la protéine hASAP délétés de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT (Ndel1 : résidus 304 -647 (SEQ ID NO: 48) ; Ndel2 : résidus 411-647 (SEQ ID NO : 49) ; Ndel3 : résidus 478-647 (SEQ ID NO : 50)) ou de la partie C-terminale contenant le domaine MAP (Cdel1 : résidus 1 à 477 (SEQ ID NO: 51) ; Cdel2 : résidus 1 à 418 (SEQ ID NO: 52) ; Cdel3 : résidus 1 à 303 (SEQ ID NO: 53) ; résidus 1 à 421 (SEQ ID NO: 47)).

15 Selon un mode de réalisation avantageux de l'Invention, ledit peptide est utile pour la production d'anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine telle que définie ci-dessus, préférentiellement reconnaissant la protéine ASAP de séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 46.

20 L'Invention a ainsi également pour objet des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement une protéine selon l'Invention.

De manière préférentielle selon l'Invention, les anticorps reconnaissent, parmi les MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine ASAP de séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 46.

25 Les anticorps selon l'Invention sont, par exemple, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')2. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal délectable et/ou quantifiable.

30 Lesdits anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain ou à partir de sérum d'animaux immunisés avec les protéines ou les peptides selon l'Invention. Les anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon les techniques bien connues de l'Homme du Métier.

L'Invention a également pour objet l'utilisation des anticorps selon l'Invention pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'Invention.

De manière générale, les anticorps selon l'Invention peuvent 5 être avantageusement utilisés pour détecter la présence d'une protéine selon l'Invention, normale ou mutée.

Particulièrement, les anticorps monoclonaux, peuvent être utilisés pour la détection de ces protéines dans un échantillon biologique. Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immuno-10 histochimique de l'expression des protéines selon l'Invention, notamment la protéine de séquence SEQ ID NO: 1, sur des coupes de tissus. Généralement pour de telles analyses, les anticorps utilisés sont marqués afin d'être détectables par exemple par des composés immunofluorescents, par marquage à l'or ou sous forme d'immunoconjugués enzymatiques.

15 Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces protéines dans les tissus ou prélèvements biologiques et ainsi permettre la détection de cellules présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou 20 multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'Invention.

L'Invention a également pour objet une méthode de détection dans un échantillon biologique de la protéine selon l'Invention, particulièrement de la protéine ASAP, comprenant une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre 25 accessible le milieu intracellulaire, une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'Invention et une troisième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé.

Cette méthode peut en outre permettre de mesurer le taux 30 d'expression de la protéine selon l'Invention dans des cellules, particulièrement dans des cellules cancéreuses. L'étude de l'expression de la protéine ASAP (sur- ou sous-expression) est un élément d'évaluation de la capacité de

prolifération ou d'agressivité (capacité à évoluer vers des cancers de mauvais pronostic) de cellules cancéreuses.

L'Invention a donc également pour objet une méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou d'agressivité des cellules cancéreuses contenues dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire, une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'Invention, une troisième étape de mise en évidence et/ou de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et une quatrième étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi. Ledit témoin peut être constitué par exemple par un échantillon biologique contenant des cellules présentant un taux de protéines normal ou altéré, auquel ladite méthode est appliquée dans les mêmes conditions.

L'Invention a également pour objet une trousse permettant de mettre en œuvre l'une quelconque des méthodes ci-dessus décrites comprenant :

- 20 a) au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'Invention ;
- b) les réactifs permettant la détection du complexe protéine ASAP-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Selon un mode de réalisation particulier de l'Invention, la trousse peut éventuellement comprendre des réactifs nécessaires pour rendre accessible le milieu intracellulaire.

Par moyen pour rendre accessible le milieu intracellulaire, on entend tout moyen connu de l'Homme du Métier comme par exemple la lyse cellulaire par voie enzymatique, chimique ou encore la sonication, la perméation membranaire, les chocs thermiques.

La présente Invention a également pour objet un polynucléotide isolé (ADNc ou fragment d'ADN génomique), caractérisé en ce que sa séquence est sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les séquences codant pour une protéine ou un peptide
- 5 tels que définis ci-dessus, et
- les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

L'Invention englobe, les allèles du gène *asap* issus de n'importe quel mammifère, ainsi que les polynucléotides des mutants naturels 10 ou artificiels du gène *asap* codant pour une protéine ASAP, particulièrement pour une protéine ASAP fonctionnelle telle que définie ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'Invention, ledit polynucléotide codant pour une protéine ASAP répond à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- 15 - la séquence SEQ ID NO: 15, correspondant à l'ADN complémentaire de 2575 nucléotides de l'ARNm codant pour la protéine ASAP humaine (hASAP) ;
- la séquence SEQ ID NO: 45, correspondant à l'ADN complémentaire de 2767 nucléotides de l'ARNm codant pour la protéine 20 ASAP murine (mASAP)
- le fragment d'ADN génomique de 29750 nucléotides répondant à la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 16, correspondant au gène *asap* humain comprenant 14 exons dont 13 seulement sont traduits, le premier exon n'étant 25 pas traduit, contenue dans le contig AC097467 (longueur 178204 paires de bases) entre les bases 115117 et 143828 (version v.7.29a3 NCBI/Ensembl du 12 juillet 2002, <http://www.ensembl.org>), par ailleurs localisée sur le chromosome 4q32.1 entre les marqueurs anonymes D4S1053 et D4S571 (région 161,25 Mégabases (Mb) à 161,28 Mb).

30 La séquence SEQ ID NO: 16 est contenue dans le clone BAC RP11-27G13 (Osoegawa, K., et col., (2001) A Bacterial Artificial Chromosome Library for Sequencing the Complete Human Genome, Genome Research,

Vol. 11, n°3, 483-496, mars 2001). Les séquences contenues dans le contig AC097467 et dans le clone BAC RP11-27G13 ont été obtenues dans le cadre du programme de séquençage du génome humain et n'ont jusqu'à présent fait l'objet d'aucune reconnaissance ni caractérisation précises permettant de leur attribuer une quelconque fonction. Deux acides nucléiques correspondants à des fragments du polynucléotide isolé par les Inventeurs sont répertoriés dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812, ainsi que les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952. Ces séquences, obtenues dans le cadre d'un programme de séquençage en masse de banques d'ADN complémentaires humains, sont incomplètes et n'ont jamais été ni reconnues ni caractérisées. En fait, le polynucléotide isolé par les Inventeurs présente de longs enchaînements de désoxyadénosines (poly-dA), ce qui explique les difficultés rencontrées par les Inventeurs pour obtenir l'ADNc complet par utilisation d'amorces oligo-désoxythymidines (oligo-dT) classiques, celles-ci s'hybridant

de manière aléatoire avec les enchaînements poly-dA. C'est par l'utilisation répétée de la technique de l'amplification rapide des extrémités 3' d'ADNc (3' Rapid Amplification cDNA end ou 3'RACE) que les Inventeurs sont parvenus à isoler le polynucléotide correspondant à l'ARNm complet.

5 L'ARNm, correspondant au polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 15, est spécifiquement exprimé dans le testicule sous la forme d'un polynucléotide d'une longueur d'environ 2,9 kilobases et dans le cerveau sous la forme d'un polynucléotide d'une longueur d'environ 9 kilobases pouvant correspondre soit à un prémessager soit à une isoforme de haut poids moléculaire.

10 De manière plus précise, lesdits exons sont répartis comme suit sur ladite séquence génomique (par rapport à la numérotation de la séquence SEQ ID NO: 16) :

- exon 1 : il comprend 200 paires de bases correspondant aux 15 positions 101 à 300 (SEQ ID NO: 17) ;
- exon 2 : il comprend 139 paires de bases correspondant aux positions 1157 à 1295 (SEQ ID NO: 18) ;
- exon 3 : il comprend 85 paires de bases correspondant aux positions 2050 à 2134 (SEQ ID NO: 19) ;
- 20 - exon 4 : il comprend 321 paires de bases correspondant aux positions 3615 à 3935 (SEQ ID NO: 20) ;
- exon 5 : il comprend 227 paires de bases correspondant aux positions 8259 à 8485 (SEQ ID NO: 21) ;
- exon 6 : il comprend 94 paires de bases correspondant aux 25 positions 14930 à 15023 (SEQ ID NO: 22) ;
- exon 7 : il comprend 248 paires de bases correspondant aux positions 16715 à 16962 (SEQ ID NO: 23) ;
- exon 8 : il comprend 71 paires de bases correspondant aux positions 19552 à 19622 (SEQ ID NO: 24) ;
- 30 - exon 9 : il comprend 169 paires de bases correspondant aux positions 21187 à 21355 (SEQ ID NO: 25) ;

- exon 10 : il comprend 90 paires de bases correspondant aux positions 21911 à 22000 (SEQ ID NO: 26) ;
- exon 11 : il comprend 162 paires de bases correspondant aux positions 23731 à 23892 (SEQ ID NO: 27) ;
- 5 - exon 12 : il comprend 146 paires de bases correspondant aux positions 24014 à 24159 (SEQ ID NO: 28) ;
- exon 13 : il comprend 133 paires de bases correspondant aux positions 24343 à 24475 (SEQ ID NO: 29) ;
- exon 14 : il comprend 485 paires de bases correspondant aux
- 10 positions 29166 à 29650 (SEQ ID NO: 30).

L'Invention a aussi pour objet :

- un fragment de l'un quelconque des polynucléotides selon l'Invention, d'au moins 15 à 1500 nucléotides consécutifs à l'exclusion des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et 15 des EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, 20 AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, 25 BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, 30 BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans

la base de données GenBank, particulièrement un fragment sélectionné parmi les séquences correspondants aux exons c'est-à-dire sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO: 16 à SEQ ID NO: 30 ;

5 - un acide nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, avec l'un des polynucléotides selon l'Invention.

La définition de l'identité d'une séquence donnée précédemment pour les protéines, s'applique par analogie aux molécules d'acide nucléique.

10 Sont inclus dans un polynucléotide présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence au moins 90 %, selon l'Invention, les polynucléotides variants des séquences SEQ ID NO: 15 et 45, c'est-à-dire l'ensemble des polynucléotides correspondants à des variants alléliques, c'est-à-dire à des variations individuelles des séquences SEQ ID NO: 15 et 15 45. Ces séquences variantes naturelles correspondent à des polymorphismes présents chez les mammifères, en particulier chez l'être humain et, notamment à des polymorphismes pouvant conduire à la survenue d'une pathologie.

On entend également désigner par polynucléotide variant, tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou d'une variation d'un site 20 d'épissage de la séquence génomique dont l'ARNm a comme ADN complémentaire le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO : 45.

25 De préférence, la présente Invention concerne les polynucléotides ou les fragments variants des séquences SEQ ID NO: 15 et 45, particulièrement ceux dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de la séquence en acides aminés des protéines de séquence SEQ ID NO: 1 et SEQ ID NO : 46.

30 Les polynucléotides selon l'Invention peuvent être isolés à partir de cellules, particulièrement des cellules de testicule ou de cerveau ou à partir de banques d'ADN cellulaire. Ils peuvent également être obtenus par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) effectuée sur l'ADN total des cellules ou encore par RT-PCR effectuée sur les ARN totaux des cellules ou par synthèse chimique.

Les polynucléotides selon l'Invention, particulièrement les fragments de l'un quelconque des polynucléotides selon l'Invention, et les séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, 5 AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, 10 BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, 15 BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, 20 BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ou leurs fragments, peuvent notamment être utilisés comme sondes ou comme amorces pour détecter/amplifier des polynucléotides (ARN ou ADN génomique) correspondants au polynucléotide 25 selon l'Invention, particulièrement dans d'autres organismes.

Les transcrits du gène *asap* sont par exemple de préférence mis en évidence à l'aide de sondes sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO : 45, SEQ ID NO: 17 à SEQ ID NO: 44 ou à l'aide d'un EST tel que défini ci-dessus ou amplifiés par RT-PCR à l'aide d'amorces sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 31 à 43.

Le polynucléotide selon l'Invention peut permettre de diagnostiquer un état pathologique ou une maladie génétique impliquant un dysfonctionnement du gène *asap* et de cribler des substances capables de moduler (activer ou inhiber) la transcription dudit gène.

5 L'Invention a aussi pour objet les polynucléotides susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide des amorces selon l'Invention.

Les sondes et amorces selon l'Invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir 10 un signal délectable et/ou quantifiable.

Le marquage des sondes selon l'Invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{33}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$ , le  $^3\text{H}$  ou l' $^{125}\text{I}$ . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels que la biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémo-luminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'Invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en œuvre

20 notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (U.S. N° 4,683,202). D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin, la technique TAS

25 (Transcription-based Amplification System), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction), la technique de RCR (Repair Chain Reaction), la technique CPR (Cycling Probe Reaction), la technique d'amplification à la Q-βeta-réplicase. On peut encore citer la PCR-SSCP qui permet

30 de détecter des mutations ponctuelles.

Ces techniques sont bien entendu parfaitement connues de l'homme du métier.

Comme sondes ou comme amorces, les différents poly-nucléotides selon l'Invention peuvent permettent, soit de déterminer le profil 5 de transcription du gène asap correspondant ou une éventuelle altération de ce profil dans un échantillon biologique, soit de mettre en évidence le gène correspondant dans d'autres espèces, des variants alléliques de ce gène ou une éventuelle altération fonctionnelle de ce gène (changement substantiel dans l'activité de la protéine codée par ledit gène) résultant d'une mutation 10 (insertion, délétion ou substitution) d'un ou plusieurs nucléotides au niveau d'au moins un exon dudit gène. De telles mutations incluent en particulier les délétions, les insertions ou les substitutions non-conservatives au niveau de codons correspondant à des résidus d'acides aminés situés dans un domaine essentiel pour l'activité biologique de la protéine.

15 Ainsi l'Invention a pour objet une méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide selon l'Invention ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise 20 en contact desdits ARN avec une sonde selon l'Invention, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

25 Par conditions classiques d'hybridation, on entend celles décrites dans Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

30 Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode, la deuxième étape peut être une étape de transcription inverse et d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces telles que décrites précédemment et la troisième étape, une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

Ladite méthode de détermination du profil de transcription du gène peut en outre comporter une étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison avec un échantillon témoin préalablement choisi. Ledit témoin peut être constitué par exemple par un échantillon biologique 5 présentant une transcription normale ou altérée du gène correspondant au polynucléotide selon l'Invention auquel ladite méthode de détermination du profil de transcription du gène est appliquée dans les mêmes conditions.

L'Invention a aussi pour objet une méthode de mise en évidence dans d'autres espèces du gène correspondant au polynucléotide 10 selon l'Invention ou des variants alléliques dudit gène ou d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir des cellules d'un échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde selon l'Invention, préalablement marquée, dans 15 des conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode, la deuxième étape peut être une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une paire d'amorces telles que décrites précédemment et la troisième étape, une 20 étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés. La méthode peut éventuellement comporter une quatrième étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

L'Invention a également pour objet une trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes précédemment décrites comprenant :

- 25 a) au moins une sonde ou une paire d'amorces selon l'Invention ;
- b) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction classique d'hybridation entre ladite sonde ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;
- 30 c) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'amplification ;

d) les réactifs nécessaires à la détection et/ou au dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

Une telle trousse peut également contenir des contrôles positifs ou négatifs afin d'assurer la qualité des résultats obtenus. Elle peut également contenir les réactifs nécessaires à la purification des acides nucléiques à partir de l'échantillon biologique.

Le polynucléotide de l'Invention ou un de ses fragments, ainsi que les EST décrits précédemment ou leur fragments peuvent servir à la mise au point de modèles cellulaires ou animaux n'exprimant pas la protéine ASAP, en invalidant le gène ASAP par la méthode de Si RNA (ou RNAi pour RNA interference ; M. McManus and P. Sharp, *Nature Reviews Genetics*, 3, 737-747, 2002 ; V. Brondani, F. Kolb, E. Billy, M/S, 6-7, 665-667, 2002) à l'aide d'oligonucléotides dérivés de leurs séquences.

L'Invention a également pour objet un vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré le polynucléotide selon l'Invention.

Un tel vecteur peut contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion de la protéine dans une cellule hôte.

Lesdits vecteurs comportent de préférence : un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement comprendre des séquences codant pour des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite tels que par exemple un promoteur fort de nature ubiquitaire ou un promoteur sélectif d'un type de cellule et/ou de tissu particulier. Ces différentes séquences de contrôle sont choisies en fonction de l'hôte cellulaire utilisé.

Le polynucléotide selon l'Invention peut être inséré dans des vecteurs à réPLICATION autonome au sein de l'hôte choisi ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

5 Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral. Les vecteurs viraux peuvent notamment être des adénovirus, des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques. L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus ou les virus associés aux adénovirus (Adeno-associated virus ou AAV).

10 Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN ou l'ARN nu, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse artificial chromosome) pour l'expression 15 dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

20 De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les vecteurs recombinants en résultant peuvent être introduits dans l'hôte approprié par des méthodes standards, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

25 L'Invention a aussi pour objet les cellules hôtes transformées, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, dans lesquelles au moins un polynucléotide ou un fragment selon l'Invention ou au moins un vecteur selon l'Invention a été introduit.

30 Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente Invention, on peut citer les cellules bactériennes, les cellules de levure, les cellules animales, en particulier les cellules de mammifères ou encore les cellules végétales. On peut citer également les cellules d'insectes dans

lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en oeuvre des baculovirus.

L'Invention a également pour objet les organismes transgéniques non-humains tels que les animaux ou les végétaux transgéniques, dont tout ou partie des cellules contient le polynucléotide selon l'Invention ou le vecteur selon l'Invention, sous une forme libre ou intégrée.

De préférence selon l'Invention, les organismes transgéniques non-humains sont ceux porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'Invention, non fonctionnel ou porteur d'une mutation.

10 Selon l'Invention les animaux transgéniques sont de préférence des mammifères, excepté l'homme, plus préférentiellement les rongeurs, en particulier les souris ou les rats.

15 Les animaux transgéniques peuvent être obtenus par toute méthode classique connue de l'homme du métier, comme par exemple par recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

20 Les cellules hôtes transformées, les animaux ou les végétaux transgéniques selon l'Invention peuvent ainsi exprimer ou surexprimer le gène codant pour la protéine selon l'Invention ou leur gène homologue ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation.

Les cellules de testicule ou de cerveau, les cellules hôtes transformées ou les organismes transgéniques selon l'Invention peuvent être utilisés pour la préparation de la protéine selon l'Invention.

25 La protéine selon l'Invention, particulièrement la protéine ASAP native, peut être purifiée selon les techniques connues de l'homme du métier. Ainsi, la protéine peut être purifiée à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, particulièrement de chromatographie d'affinité, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc...

L'Invention a également pour objet une méthode de préparation de la protéine ASAP, se caractérisant en ce que l'on cultive des cellules exprimant la protéine ou des cellules transformées selon la présente Invention, notamment les cellules de mammifères ou les cellules d'organismes 5 transgéniques selon l'Invention, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine.

10 Comme technique de purification, on peut citer par exemple la chromatographie d'affinité sur glutathione-sépharose (ou agarose) telle que décrite dans Sambrook J & Russell DW. (2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

L'Invention a également pour objet une protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par l'une quelconque des méthodes de préparation ci-dessus décrites.

15 L'Invention a encore pour objet une méthode de criblage d'une substance capable d'interagir *in vitro*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact la substance à tester et le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention et
- dans une deuxième étape on détecte par tout moyen approprié le complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention.

20 La présente invention a également pour objet une méthode de criblage d'une substance capable de moduler (activer ou inhiber) l'activité de la protéine ASAP, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact des cellules d'un échantillon biologique exprimant la protéine ASAP avec une substance à tester,
- dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine ASAP, et
- dans une troisième étape on sélectionne des substances capables de moduler ladite activité.

Au sens de la présente invention, on entend par activité de la protéine ASAP, aussi bien l'expression de la protéine ASAP ou des transcrits (ARNm) correspondants, que l'activité biologique de ladite protéine ASAP, comme par exemple son effet sur l'organisation du fuseau mitotique ou 5 l'induction de mitoses aberrantes et abortives.

La détection du complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine ou la mesure de l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine ASAP peuvent être réalisées par les techniques classiques d'analyse d'ARNm ou de protéines qui sont connues en 10 elles-mêmes ; à titre d'exemple non-limitatif, on peut citer les techniques suivantes : RT-PCR, Northern-blot, Western-blot, RIA, ELISA, immunoprécipitation, techniques d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique.

Avantageusement, ladite mesure est réalisée à l'aide des sondes, des amorces ou des anticorps, tels que définis ci-dessus.

15 De telles substances peuvent être des macromolécules biologiques comme par exemple un acide nucléique, un lipide, un sucre, une protéine, un peptide, un composé hybride protéine-lipide, protéine-sucre, peptide-lipide ou peptide-sucre, une protéine ou un peptide sur lequel on a ajouté des ramifications chimiques ou encore des molécules chimiques.

20 L'Invention a également pour objet le polynucléotide, la protéine, les anticorps, les vecteurs ou les cellules transformées selon l'Invention, utilisés comme médicaments.

25 Comme indiqué précédemment, la surexpression de la protéine selon l'Invention bloque la division cellulaire et par conséquent la prolifération cellulaire. Cela en fait un excellent candidat pour une utilisation comme agent anti-mitotique, utilisable par exemple dans le traitement des pathologies cancéreuses.

30 Ainsi, l'Invention a également pour objet l'utilisation du polynucléotide, d'un vecteur ou de la protéine selon l'Invention, dans la préparation d'un médicament anti-mitotique.

De même comme il est également indiqué précédemment, la surexpression de la protéine selon l'Invention entraîne des perturbations dans

l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives (cellules pluriplurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires).

Ainsi, l'Invention a aussi pour objet l'utilisation d'un polynucléotide anti-sens ou d'un fragment anti-sens, d'un anticorps, d'un vecteur 5 contenant un oligonucléotide anti-sens selon l'Invention, capables d'inhiber l'expression du polynucléotide ou de la protéine selon l'Invention, dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules pluriplurinucléées, fuseaux mono- ou 10 multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'Invention.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'Invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

15 - La Figure 1 représente la localisation chromosomique et la structure du gène *asap* humain.

- La Figure 2 représente les signaux obtenus par Northern blots sur différents tissus humains après hybridation avec une sonde hASAP.

- La Figure 3 représente les résultats obtenus :

20 (A) par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR obtenus avec des amorces correspondant au polynucléotide de souris, orthologue du polynucléotide SEQ ID NO: 15, à partir de différents tissus de souris.

(B) Après transfert du gel après électrophorèse sur une 25 membrane et hybridation avec une sonde mASAP interne.

- La Figure 4 représente la localisation cellulaire de la protéine hASAP couplée à la Green Fluorescent Protein (GFP) en 3' ou la Yellow Fluorescent Protein (YFP) en 5' ou à un tag MYC du côté N-terminal (colonne fusion).

30 Les noyaux sont colorés à l'iodure de propidium ou au Hoechst 33286. (4A : objectif 63x ; 4B, 4C, 4D : objectif 100X).

- La Figure 5 montre la co-localisation de la protéine ASAP

humaine avec l'alpha-tubuline. Figure 5 A : localisation cellulaire de l'alpha-tubuline, Figure 5 B : localisation de la protéine ASAP, Figure 5 C : superposition des 2 images montrant la colocalisation des 2 protéines.

Les exemples suivants sont illustratifs de l'Invention et ne la limitent aucunement.

**EXEMPLE 1 : Construction de la séquence codante ASAP complète :**

On amplifie la séquence complète de l'ADNc de la protéine ASAP à partir de 2 fragments chevauchants :

- un fragment A amplifié par PCR à partir du clone AI885274  
10 avec les amorces :

constFIS-1F (5'-ATGTCTGATGAAGTTTTAGCACC-3') (SEQ ID NO: 31) et

constFIS-2R (5'-AGGCCTCAAATGATGCTAATGC-3') (SEQ ID NO: 32) ;

15 - un fragment B amplifié à partir du clone AI671785 avec les amorces :

constFIS-2F (5'-ATCATTGAGGCCTGGAAGGC-3') (SEQ ID NO: 33) et

et constFIS-1R (5'-AACACTTTGCGAACACAGTTC-3')  
20 (SEQ ID NO: 34).

Puis, pour obtenir un produit PCR unique correspondant à la séquence complète de l'ADNc de la protéine ASAP, utilisable pour les expériences de fonction, 0,5 µl des produits de chacune des 2 réactions PCR (fragment A et B) sont hybridés ensemble à 25°C puis amplifiés avec les amorces constFIS-1F et constFIS-2F. Ce produit PCR est sous-cloné dans le vecteur PCR4 suivant les recommandations du fabricant (Invitrogen) et vérifié par séquençage.

Les difficultés majeures rencontrées se sont situées dans la détermination *in silico* de la séquence codante complète ASAP et de sa reconstruction *in vitro*. En particulier, le choix des amorces et des différentes PCR de la région 3' ont été délicats en raison de la richesse de la séquence en polyA.

### **EXEMPLE 2 : Analyse bio-informatique**

La Figure 1 représente la localisation chromosomique et la structure du gène *asap* humain.

L'organisation complète du gène *asap* et sa localisation chromosomique ont été obtenues en comparant la séquence de l'ADNc obtenu à l'exemple 1, à la séquence du génome humain en utilisant les programmes du Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.ensembl.org/genome/central/> et plus précisément le programme de recherche BLAST (<http://genome.cse.ucsc.edu/>).

Le gène humain *asap* est constitué de 29750 nucléotides comprenant 14 exons dont 13 seulement sont traduits, le premier exon n'étant pas traduit. La taille des exons s'échelonne de 71 à 321 paires de bases. La séquence du gène est contenue dans le contig AC097467 (longueur 178204 paires de bases) entre les bases 115117 et 143828 (version v.7.29a3 NCBI/Ensembl du 12 juillet 2002, <http://www.ensembl.org>), et est par ailleurs localisée sur le chromosome 4q32.1 entre les marqueurs anonymes D4S1053 et D4S571 (région 161,25 Mégabases (Mb) à 161,28 Mb). La séquence du gène est physiquement contenue dans le clone BAC RP11-27G13.

Deux acides nucléiques correspondants à des fragments du polynucléotide isolé par les Inventeurs sont répertoriés dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812, ainsi que les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289,

BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, 5 BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952. Ces séquences, obtenues dans le cadre d'un programme de séquençage en masse de banques d'ADN complémentaires humains, sont incomplètes et 10 n'ont jamais été ni reconnues ni caractérisées.

La séquence protéique a été comparée aux séquences des banques de données en utilisant les programmes PSI-BLAST et PHI-BLAST du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sitemap/>). Des motifs protéiques consensus ont été recherchés en utilisant les programmes DART du NCBI et 15 SMART d'ExPASy-Tools (<http://www.expasy.ch/tools/#similariw>), dont les paramètres permettent de détecter des motifs de faible homologie. La protéine ASAP présente une identité de séquence de 23% sur le tiers C-terminal avec une protéine associée aux microtubules (MAP 1A pour Microtubule-Associated-Protein 1A). Par ailleurs la recherche de motifs 20 conservés (DART on SMART) révèle des domaines de type caldesmon (Gusev, N.B., Biochemistry, 10 : 1112-1121, 2000) et ERM (Ezrin/radixin/moesin) (Louvet-Vallet, S., Biol. Cell, 274 : 305-316, 2000), qui sont des protéines également considérées comme des MAPs, avec des identités d'environ 20%. Elle présente également un domaine BRCT (Breast 25 cancer carboxy-terminal domain ; Bork, P., et coll., FASEB J., 11, 68-76 (1997)) entre les positions 65 et 303.

La protéine ASAP présente des domaines coiled-coil essentiellement regroupés dans sa partie C-terminale entre les acides aminés 297 et 327 d'une part et 477 et 628 d'autre part, indiquant soit que la protéine 30 s'oligomérise, soit qu'elle interagit avec d'autres protéines.

L'analyse informatique de la protéine à l'aide des programmes accessibles dans le site internet (<http://npsa-bil.ibcp.fr/cgi>-

bin/npsa\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\_secons.html), révèle l'absence de feuillet  $\beta$  et une très grande richesse en hélices  $\alpha$ , en particulier pour la région comprise entre les acides aminés 420-620, presque exclusivement formées d'hélices  $\alpha$ .

5 Ces éléments permettent de penser que la protéine ASAP est une nouvelle MAP.

### **EXAMPLE 3 : Expression tissulaire**

#### **a) Analyse par Northern blot**

Préparation des sondes radioactives :

10 Les ADN à radiomarquer sont isolés sur gel à bas point de fusion (LMP) selon la technique décrite dans Rouquier, S. et al., (Genomics, 17, 330-340, (1993)). Environ 100 ng d'ADN ainsi isolé, sont marqués par amorçage aléatoire (fragment de Klenow, Proméga) en présence de [ $\alpha^{32}$ P dCTP] (Amersham) selon la technique décrite dans Feinberg, A.P. & 15 Vogelstein, B., (Anal. Biochem., 132, 6-13, (1983)). Ces sondes sont purifiées sur des colonnes de Sephadex G-50 selon la technique décrite dans Sambrook J & Russell DW. (2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Les hybridations s'effectuent durant la nuit en présence de  $2.10^6$  Cpm/ml de sonde radioactive dénaturée.

20 **a.1) Hybridation**

Deux membranes Northern Blot de la société Clontech, (Human MTN Blot at Human MTN Blot II, Réf. 7760-1 et 7759-1) comportant des ARNm humains de différents tissus ont été hybridées avec l'ADNc hASAP complet marqué comme décrit ci-dessus. La membrane est hybridée en 25 présence de formamide à 42°C, en suivant le protocole Clontech. Un contrôle d'hybridation de la membrane est réalisé avec une sonde actine. La membrane est rincée 2 fois à haute stringence en 0,1X SSC/0,1% SDS à la température de 42°C, pendant 15 minutes. Les membranes sont alors analysées par autoradiographie ou au Phosphorimager.

30 Les tissus testés sont : la rate, le thymus, la prostate, le testicule, l'ovaire, l'intestin grêle, le colon, les leucocytes sanguins, le cœur, le

cerveau, le placenta, le poumon, le foie, le muscle squelettique, le rein et le pancréas.

**a.2) Résultats**

La Figure 2 illustre ces résultats.

5

Deux signaux sont détectés :

- un signal dans le testicule à environ 2,6 kb, ce qui correspond à la taille de l'ARNm ;

- un signal dans le cerveau mais à un haut poids moléculaire (9 kb) qui correspond soit à un prémessager, soit à une isoforme de haut poids moléculaire

10

**b) Analyse par RT-PCR**

15

Cette analyse a été effectuée sur des ARNs totaux de différents tissus de souris, à savoir le cerveau, le cœur, le colon, le foie, l'intestin grêle, le muscle squelettique, le pancréas, le poumon, le rein, la rate et le testicule.

**b.1) Obtention de l'ADNc orthologue de souris**

20

Les ARNs totaux de cellules de différents tissus de souris sont extraits avec le "mammalian total RNA kit" de la société Sigma. Les ARN sont rétro-transcrits avec le kit Superscript II de la société Invitrogen selon les conditions prescrites par le fournisseur et en utilisant des amores oligodT. Les produits obtenus sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. 1 µl de chaque échantillon ainsi obtenu est à son tour amplifié par PCR (25 µl de milieu de réaction, 30 cycles (94°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 30 secondes)) avec des amores spécifiques du 25 gènes *asap* de souris (mFIS-1F, 5'-ACA ACG AAT AAC AGA GTG TCC-3' (SEQ ID NO: 35) et mFIS-2R, 5'-ACT CCT GAT AAA CAG CTG CC-3' (SEQ ID NO: 36)).

25

Les produits amplifiés obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, colorés au bromure d'éthydium et leur taille comparée à un marqueur de taille déposé sur le gel en parallèle.

30

Après électrophorèse, les produits amplifiés obtenus sont transférés par capillarité sur membrane de nylon chargée, dans le tampon

NaCl 1,5M/NaOH 0,5M, selon la technique de Southern (transfert alcalin). La membrane est ensuite hybridée avec une sonde radiomarquée mASAP, (SEQ ID NO: 44), générée par amplification de la séquence contenue dans le clone de souris AW06131 sélectionné après comparaison de la séquence ASAP humaine dans les banques de données (GenBank) ([http://expression.gnf.org/promoter/tissue/images/41739\\_s\\_at.png](http://expression.gnf.org/promoter/tissue/images/41739_s_at.png)).

L'amplification a été réalisée par PCR (conditions telles que décrites ci-dessus dans lesquelles le volume de réaction est de 50 µl et le dCTP froid est à la concentration de 10 µM supplémenté avec 50 µCi d' $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTP à 3000Ci/mmol), en utilisant les amorces mFIS-1F (SEQ ID NO: 35) et mFis-2R (SEQ ID NO: 36). Les hybridations sont réalisées à 65°C (dans du tampon 6X SSC/0,5% SDS/5X Denhardt). La membrane est rincée à forte stringence (0,1X SSC/0,1% SDS), puis analysée par autoradiographie ou au PhosphorImager.

15 b.2) Résultats

La Figure 3 illustre ces résultats.

On constate qu'on obtient un signal majoritaire dans le testicule et le cerveau, nettement visible sur gel (Figure 3A).

Après transfert du gel et hybridation avec une sonde interne, 20 on constate que l'on détecte un signal très faible dans les autres tissus (Figure 3B).

Par conséquent l'ARNm codant pour la protéine mASAP est majoritairement exprimé dans le testicule et le cerveau. L'ADNc complet de souris, amplifié par RT-PCR à partir de l'ARN de testicule de souris, 25 correspond à la séquence SEQ ID NO : 45 et la protéine correspondante (mASAP) à la séquence SEQ ID NO : 46.

**EXAMPLE 4 : Localisation cellulaire**

a) Sous-clonage de l'ADNc hASAP dans un vecteur d'expression eucaryote

L'ADNc hASAP obtenu à l'exemple 1 est inséré dans trois 30 vecteurs d'expression :

1- dans pEAK10-EGFP en phase avec la Green Fluorescent Protein (GFP) fusionnée en C-terminal (vecteur 1) (pEAK10, vecteur de Edge

Biosystems (distribué par Q.BIOgene, Illkirch en France) dans lequel a été introduit la protéine EGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) suivant la référence Gaillard, I., et al., Eur. J. Neurosci., 15, 409-418, 2002) ;

2- dans pEYFP-C1 en phase avec la Yellow Fluorescent Protein (YFP) fusionnée du côté N-terminal (vecteur 2) (distribué par BD Biosciences Clontech)) ;

3- dans GLOMYC3-1 comportant un tag MYC du côté N-terminal (vecteur 3) , vecteur dérivé du vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen), dans lequel ont été insérées une région 5' non-traduite (5' UTR) et un tag MYC aux sites *HindIII-BamHI*, et la région 3'UTR de la globine (fragment *SpeI-XbaI* dans le site *XbaI*).

L'ADNc hASAP est amplifié à partir de son vecteur de clonage initial (pCR4-TOPO) par PCR en utilisant la polymérase haute-fidélité pfu Turbo, à l'aide d'amorces amplifiant l'ADNc entre la méthionine de départ et le dernier acide aminé. Les produits amplifiés obtenus sont sous-clonés dans les 3 vecteurs.

- Clonage dans PEAK-GFP. Préparation de l'insert d'ADN par PCR [94°C 2 min ; (94°C 15 sec.; 58°C 30 sec.; 72°C 1min 30 sec.) 30 cycles ; 72°C 3 min.], à l'aide des amorces hFIS-Exp1F (5'-GCCACCATGTCTGATGAAGTTTTAGCAC-3) (SEQ ID NO: 37) et hFIS-Exp1R (5'-GAAACACTTTGCGAACACAGTTC-3') (SEQ ID NO: 38).

Le vecteur est coupé par *EcoRV* et déphosphorylé : 10 ng de vecteur sont utilisés pour la ligation avec l'insert d'ADN. Le produit PCR est phosphorylé puis purifié sur high PURE PCR kit (Roche) : 100 ng d'insert sont utilisés pour la ligation [12h à 16°C dans 10 µl final (ligase Biolabs), suivant les conditions standards (Sambrook and Russell)].

- Clonage dans Glomyc : Préparation de l'insert d'ADN par PCR [94°C 2 min ; (94°C 15 sec.; 60°C 30 sec.; 72°C 1min 30 sec.) 30 cycles ; 72°C 3 min.], à l'aide des amorces : Glomyc-FIS1F : (5'-TAATGTCTGATGAAGTTTTAGCACC-3') (SEQ ID NO: 39) et

Glomyc-FIS1R : (5'-TCAAAACACTTTGCGAACACAGTTC-3') (SEQ ID NO: 40).

Conditions de clonage identiques à celles décrites pour le clonage dans PEAK-GFP.

5 - Clonage dans YFP : Préparation de l'insert d'ADN : mêmes conditions que pour Glomyc, à l'aide des amorces : YFP-FIS1F (5'-AATGTCTGATGAAGTTTTAGCACC-3') (SEQ ID NO: 41) et Glomyc-FIS1R (SEQ ID NO: 40) (cf ci-dessus).

10 Conditions de clonage identiques à celles décrites pour le clonage dans PEAK-GFP, le vecteur ayant préalablement été coupé par *Sma*1.

Les recombinants sont analysés par PCR en utilisant une amorce du vecteur et une amorce interne.

15 PEAK-GFP : annealing à 58°C, extension 45 sec. à 72°C. et conditions standards pour le reste. Amorces : constFIS-2F (SEQ ID NO: 33) et GFP-1R (5'-TCAGCTTGCCGTAGGTGGC-3') (SEQ ID NO: 42).

YFP : annealing 55°C pendant 1 min. ; Amorces : YFP-2F (5'-ATGGTCCTGCTGGAGTTCG-3') (SEQ ID NO: 43) et hFIS-Exp1R (SEQ ID NO: 38) .

20 Glomyc : annealing 44°C, extension 45 sec. à 72°C. Amorces : constFIS-2F (SEQ ID NO: 33) et SP6. Les recombinants sont séquencés par séquençage automatique à façon à partir des produits PCR (Genome Express, Meylan).

b) Sous-clonage de l'ADNc hASAP dans un vecteur d'expression procaryote

25 En utilisant une stratégie similaire à celle utilisée au paragraphe a) ci-dessus, l'ADNc hASAP a été cloné dans le vecteur pGEX-4T2 (AMERSHAM), de façon à produire une protéine de fusion avec la GST, purifiable selon les protocoles standards.

c) Sous-clonage de l'ADNc mASAP dans un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote

30 En utilisant une stratégie similaire à celle utilisée au paragraphe a) ci-dessus, l'ADNc mASAP a été cloné dans les vecteurs suivants :

- pGEX-4T2, (AMERSHAM), de façon à produire une protéine de fusion avec la GST, purifiable selon les protocoles standards.

- pEYFP-C1 de façon à produire une protéine de fusion (fusion N-terminale) avec la Yellow Fluorescent Protein (YFP) détectable par 5 immunofluorescence directe.

d) Transfection, immunofluorescence et microscopie

d.1) matériels et méthodes

Les vecteurs obtenus sont transfectés selon la technique au phosphate de calcium ou de façon plus routinière en utilisant le procédé 10 jetPEI (GDSP10101, Qbiogene) suivant les recommandations du fabricant, dans les lignées cellulaires suivantes :

- PEAK (ref. 37937, Edge Biosystems (distribué par Q.BIOgene, Illkirch en France), uniquement pour les constructions ASAP humaines,

15 - HEK-293 (ATCC (American Tissue Culture Collection) référence CRL-1573 ; p53 -/- non synchronisable), pour les constructions ASAP humaines et murines,

- NIH3T3 non-transformées (constructions ASAP murines), et - U-2 OS (ATCC HTB-96 ; p53 +/-, synchronisable)

20 Pour les vecteurs 1) et 2) (constructions ASAP humaines et murines), les localisations se font directement par détection de la fluorescence de la GFP ou de l'YFP à 24h, 48h et 72h après fixation des cellules au paraformaldéhyde et coloration des noyaux soit au propioiodure de propidium, soit au Hoechst 33286.

25 Pour le vecteur 3) la détection du tag MYC est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire anti-MYC distribué par TEBU (9 E10, cat.#SC-40, Santa Cruz Biotechnology, CA) et d'un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris marqué au fluorochrome Alexa-594 (Molecular Probes, ref. A-11032, distribué en France par Interchim, Montluçon), après la fixation des 30 cellules et leur perméabilisation au Triton X100 0,1%. Les lames sont analysées, et les images collectées sur un microscope Zeiss Axiophot.

d.2) Résultats : Localisation cellulaire et colocalisation de la protéine ASAP avec l'alpha-tubuline  
- localisation cellulaire

La Figure 4 illustre la localisation cellulaire de la protéine 5 hASAP surexprimée dans la lignée HEK-293 (IP = Iodure de propidium).

L'observation au microscope à fluorescence des lames correspondant aux différentes transfections par les vecteurs 1), 2) et 3) montrent les mêmes types de profil : la localisation des protéines hASAP et mASAP est cytoplasmique et son profil fibreux rappelle celui des filaments de 10 tubuline.

Par ailleurs, il semble que les cellules transfectées présentent des défauts de division car les noyaux sont toujours plus gros que dans les cellules non transfectées (Figure 4A et 4B). De plus, certaines des cellules transfectées semblent pluri nucléées (Figure 4B). Ceci suggère une division 15 anormale des cellules transfectées.

Enfin, la mitose des cellules transfectées semble anormale, tant au niveau de l'organisation des chromosomes, que du profil de localisation des protéines hASAP et mASAP au niveau du fuseau mitotique. Le profil de localisation des protéines hASAP et mASAP, en étoile, est caractéristique 20 de la nucléation des microtubules en aster autour du centrosome (Figures 4C et 4D).

Un profil similaire de localisation de la protéine ASAP est détecté dans la lignée U-2 OS (p53 +/-) surexprimant hASAP et dans la lignée 25 NIH 3T3 non-transformée surexprimant mASAP ; une accumulation de cellules monopolaires en mitose est observée.

En outre, en synchronisant les cellules U-2 OS et en récupérant les extraits cellulaires à différents moments du cycle, il a été vérifié que la protéine ASAP était bien présente dans toutes les phases du cycle cellulaire (interphase, S, G2/M).

30 - colocalisation de la protéine ASAP avec l'alpha-tubuline

La Figure 5 illustre la co-localisation de la protéine ASAP humaine avec l'alpha-tubuline ; de même la protéine ASAP murine co-localise

avec l'alpha-tubuline.

La Figure 5 A illustre la localisation cellulaire de l'alpha-tubuline détectée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-tubuline (Alexa-594, Molecular Probe).

5 La Figure 5 B illustre la localisation de la protéine ASAP marquée à la YFP (yellow fluorescent protein).

La Figure 5 C représente la superposition des 2 images démontrant la colocalisation des 2 protéines.

**EXAMPLE 5 : Production d'anticorps polyclonaux anti-hASAP et mASAP**

10 a) Production d'anticorps

Les constructions suivantes de la protéine ASAP ont été clonées dans le vecteur d'expression procaryote pGEX 4T-2 (AMERSHAM) comme décrit à l'exemple 4 :

15 - protéine ASAP humaine entière (SEQ ID NO : 1)  
- protéine humaine délétée de sa partie C-terminale contenant le domaine MAP potentiel (résidus 1 à 421, SEQ ID NO : 47)  
- protéine murine entière (SEQ ID NO : 46).

20 Les protéines ont été exprimées dans *E. coli* et purifiées selon les protocoles standards. Des lapins ont ensuite été immunisés avec les protéines ASAP purifiées selon un protocole standard, et les sérums immuns ont été récoltés.

25 b) Analyse de la réactivité des sérums polyclonaux vis-à-vis de la protéine ASAP endogène.

Les sérums polyclonaux monospécifiques dirigés contre la protéine hASAP entière ou délétée de sa partie C-terminale contenant le domaine MAP potentiel, ont été testées en Western-blot et en immunofluorescence, sur des cellules HEK-293 et U-2 OS, selon des protocoles standards.

30 En Western-blot, le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine hASAP entière détecte une protéine d'un poids moléculaire apparent d'environ 110 kDa correspondant à la protéine ASAP endogène, aussi bien dans les cellules HEK-293 que les cellules U-2 OS. Dans ces conditions, un anticorps anti-FLAG, détecte une protéine de poids moléculaire

équivalent, dans des cellules contrôle HEK-293 ou U-2 OS, transfectées par un vecteur d'expression de la protéine hASAP fusionnée avec une étiquette FLAG.

En immunofluorescence, le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine hASAP entière marque les microtubules des cellules HEK-293 en interphase, les asters des cellules en mitose et les microtubules du corps résiduel en fin de télophase.

Le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine hASAP délétée de sa partie C-terminale contenant le domaine MAP potentiel présente le même profil en immunofluorescence et détecte une protéine d'environ 110 kDa, en Western blot.

Le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine mASAP est utilisé pour détecter quels sont les types cellulaires exprimant ASAP et à quel(s) stade(s) du cycle cellulaire elle est exprimée, par immunofluorescence sur des coupes testiculaires de souris.

**EXAMPLE 6 : Analyse fonctionnelle de la protéine hASAP à l'aide de mutants délétés de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT ou de la région C-terminale contenant le domaine MAP potentiel.**

Des fragments d'ADNc codant pour une protéine hASAP délétée de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT (Ndel1 : résidus 304 -647 (SEQ ID NO : 48) ; Ndel2 : résidus 411-647 (SEQ ID NO : 49) ; Ndel3 : résidus 478-647 (SEQ ID NO : 50)) ou de la partie C-terminale contenant le domaine MAP (Cdel1 : résidus 1 à 477 (SEQ ID NO : 51) ; Cdel2 : résidus 1 à 418 (SEQ ID NO : 52) ; Cdel3 : résidus 1 à 303 (SEQ ID NO : 53)) ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces appropriées puis clonés dans les vecteurs d'expression pEAK10-EGFP (fusion C-terminale avec la GFP) et pEYFP-C1 (fusion N-terminale avec la YFP) selon un protocole similaire à celui décrit à l'exemple 4.

Les différentes constructions ont été transfectées dans les lignées HEK-293 et U-2 OS puis la localisation cellulaire des différents mutants de la protéine hASAP a été analysée comme décrit à l'exemple 4.

On constate que pour les mêmes délétions, un profil similaire est obtenu avec la construction comportant la YFP en N-terminal ou la GFP en C-terminal.

Par comparaison avec la protéine hASAP entière, les 3 constructions délétées de la partie C-terminale ne colocalisent plus en interphase avec la tubuline et ne présentent plus un aspect fibreux ; ces résultats indiquent que la délétion intéresse un domaine MAP. En outre, aucune cellule monopolaire bloquée en mitose n'est observée dans les cellules surexprimant les mutants délétés de la partie C-terminale contenant le domaine MAP.

Par comparaison avec la protéine hASAP entière, les 3 constructions délétées de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT, présentent une localisation nucléaire sous forme de foyers mais il reste dans le cytoplasme quelques fibres co-localisant avec la tubuline.

L'analyse fonctionnelle de la protéine hASAP est complétée par des expériences d'inactivation de l'expression du gène par des ARN interférents (ARNi).

## REVENDICATIONS

1°) Protéine isolée, dénommée ASAP, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

5 a) une protéine répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1, correspondant à la protéine ASAP humaine, et

10 b) une protéine présentant, sur la totalité de sa séquence, au moins 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou moins 95% de similarité, avec la protéine de séquence SEQ ID NO: 1.

2°) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO: 46 correspondant à la protéine ASAP murine.

15 3°) Peptide, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un fragment d'au moins 10 acides aminés consécutifs d'une protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2.

20 4°) Peptide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste de séquence en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 2 à SEQ ID NO: 14 et SEQ ID NO: 47 à 53.

5°) Protéine variante de la séquence SEQ ID NO: 1 ou de la séquence SEQ ID NO: 46, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation entraînant un dysfonctionnement de la protéine.

25 6°) Protéine ou peptide selon l'une quelconque des revendications 1, 3, 4 ou 5, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine ou d'un peptide d'origine humaine.

7°) Polynucléotide isolé, répondant à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

30 - les séquences codant pour une protéine ou pour un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ;

- les séquences représentées sous les numéros SEQ ID NO: 15 et SEQ ID NO: 45 dans la liste de séquences en annexe, correspondant respectivement aux ADNc ASAP humain et murin,
- le fragment d'ADN génomique de 29800 nucléotides 5 répondant à la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 16, correspondant au gène *asap* humain ;
  - un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de l'une quelconque des séquences précédentes, à l'exclusion des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et des EST 10 répertoriés sous numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, 15 AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, 20 BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, 25 BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ;
    - un fragment de l'un quelconque des séquences précédentes, sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste des séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 16 à SEQ ID NO: 30 ;

- une séquence présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, après alignement optimal avec l'une des séquences ou l'un des fragments précédents ;
- les séquences complémentaires des précédentes, sens ou 5 anti-sens.

8°) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide variant de la séquence SEQ ID NO: 15 ou 45.

9°) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 8, 10 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide porteur d'au moins une mutation conduisant à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondant à la séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID N : 46.

10°) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou de l'une des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et d'un des EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, 15 BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, 20 BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, 25 BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, 30 BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, 35 AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835,

AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ou de leurs fragments, comme sonde pour détecter, identifier ou doser des polynucléotides correspondants au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, particulièrement dans d'autres organismes.

11°) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la sonde est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 15, 45 ou SEQ ID NO: 17 à SEQ ID NO: 44.

12°) Amorce pour l'amplification des polynucléotides (ARN ou ADN génomique) correspondants au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, particulièrement dans d'autres organismes caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 31 à 43.

13°) Polynucléotide susceptible d'être obtenu par amplification à l'aide des amorces selon la revendication 12.

14°) Méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13, ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde telle que définie aux revendications 10 ou 11 préalablement marquée dans des conditions classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

15°) Méthode selon la revendication 14, dans laquelle la deuxième étape est une étape de transcription inverse et/ou d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 12 et la troisième étape est une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés.

16°) Méthode selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'évaluation du

taux de transcription du gène par comparaison à un témoin préalablement choisi.

17°) Méthode de mise en évidence dans d'autres espèces du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13, ou de mise en évidence des variants alléliques dudit gène ou de mise en évidence d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde telle que définie aux revendications 10 ou 11, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

18°) Méthode selon la revendication 17, dans laquelle la deuxième étape est une étape d'amplification réalisée à l'aide d'amorces selon la revendications 12 et la troisième étape une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

19°) Méthode selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

20 20°) Trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes selon l'une quelconque des revendications 14 à 19 comprenant :

- au moins une sonde telle que définie aux revendications 10 ou 11 et/ou des amorces selon la revendication 12 ;
- les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction classique d'hybridation entre ladite sonde et/ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;
- les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'amplification ;
- les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

21°) Vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13.

5 22°) Cellules hôtes transformées, dans lesquelles au moins un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou au moins un vecteur selon la revendication 21 a été introduit.

10 23°) Organismes transgéniques non-humains, dont tout ou partie des cellules contient au moins un polynucléotide ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 123 ou au moins un vecteur selon la revendication 20, sous une forme libre ou intégrée.

15 24°) Organismes transgéniques non-humains selon la revendication 23 caractérisés en ce qu'ils sont porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 non fonctionnel ou porteur d'une mutation.

25 25°) Utilisation d'une cellule transformée selon la revendication 22 ou d'un organisme transgénique non-humain selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, pour la production d'une protéine ou d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

20 26°) Méthode de préparation d'une protéine ou d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'on cultive des cellules exprimant la protéine ou des cellules transformées selon la revendication 22 ou un organisme transgénique selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine.

25 27°) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par la méthode de préparation selon la revendication 26.

28°) Anticorps mono- ou polyclonal caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître spécifiquement une protéine ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

30 29°) Anticorps selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il reconnaît, parmi les MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine ASAP de séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 46.

30°) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

31°) Méthode de détection d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, dans les cellules d'un échantillon biologique, comprenant

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,

10 - une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 et

- une troisième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé.

15 32°) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 pour la détection et/ou la sélection de cellules présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

20 33°) Méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou d'agressivité de cellules cancéreuses comprenant

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,

25 - une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29,

- une troisième étape de mise en évidence et de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et

30 - une quatrième étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi.

34°) Trousse permettant de mettre en oeuvre la méthode selon l'une quelconque des revendications 31 ou 33 comprenant :

- au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ;
- 5 - les réactifs permettant la détection du complexe protéine ASAP-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

35°) Méthode de criblage d'une substance capable d'interagir *in vitro*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou la protéine ou un peptide selon 10 l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact la substance à tester et le polynucléotide ou la protéine et
- dans une deuxième étape on détecte par tout moyen approprié le complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la 15 protéine.

36°) Méthode de criblage d'une substance capable de moduler l'activité de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact des cellules d'un échantillon biologique exprimant la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, avec une substance à tester,
- dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié de l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine, et
- dans une troisième étape on sélectionne des substances 25 capables de moduler ladite activité.

37°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27 ou polynucléotide ou fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ou vecteur selon la revendication 21 ou cellule transformée selon la 30 revendication 22, utilisé comme médicaments.

38°) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27 ou d'un polynucléotide ou d'un fragment selon

l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ou d'un vecteur selon la revendication 21 ou d'une cellule transformée selon la revendication 22, dans la préparation d'un médicament anti-mitotique.

5                   39°) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment anti-sens selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ou d'un vecteur contenant un oligonucléotide anti-sens selon la revendication 21 et capable d'inhiber l'expression du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à  
10               9 ou de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ,5, 6 dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives, liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

1/5

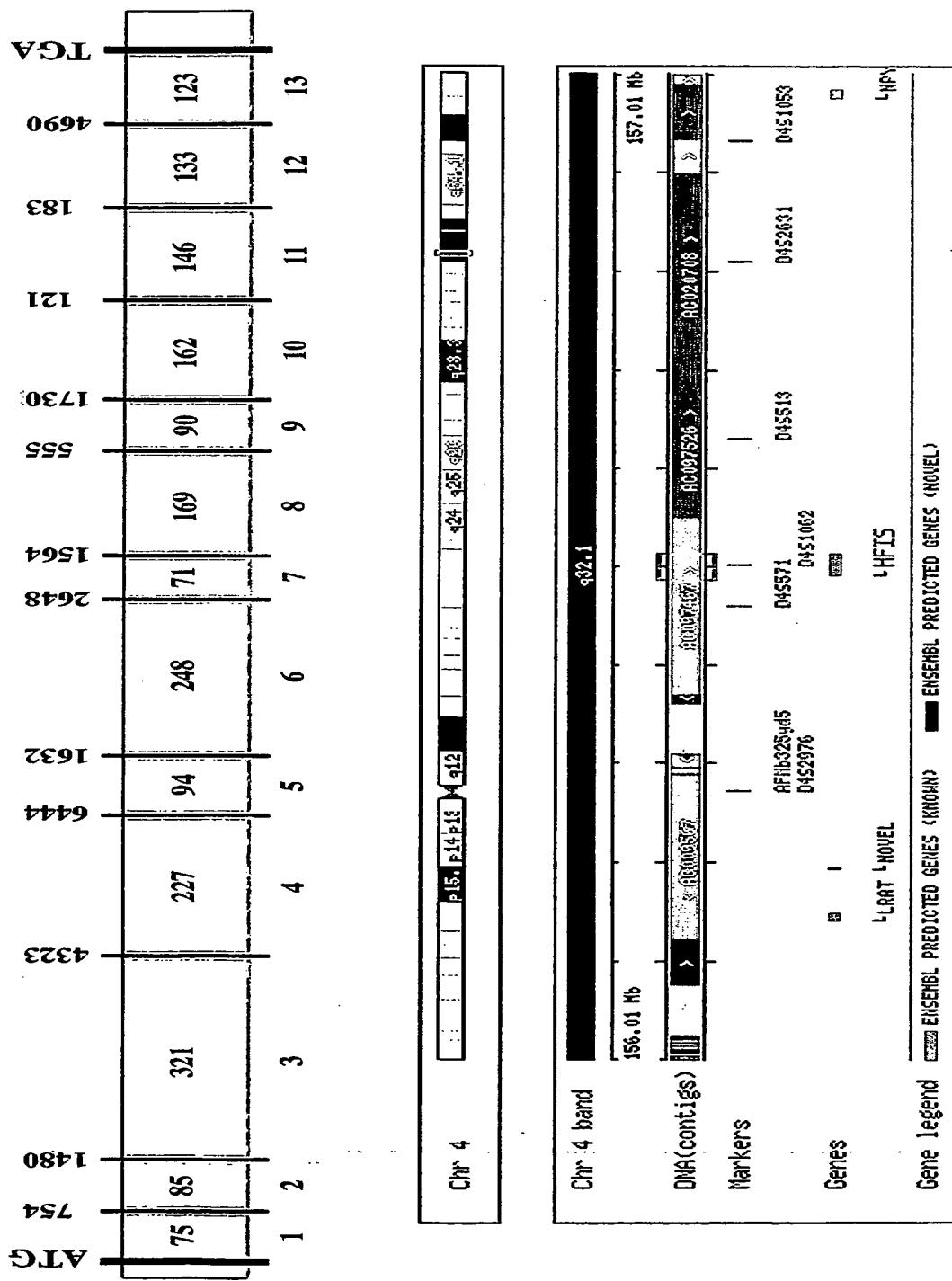


Figure 1

USPTO RECEIVED BY USPTO 24 JUN 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/5

Rate	Thymus	
Prostate		
Testicule		
Ovaire		
Intestin grêle		
Colon		
	Leucocyte du sang périphérique	
Coeur		
Cerveau		
Placenta		
Poumon		
Liver		
Muscle squelettique		
Rein		
Pancreas		

9 kb -

2,6 kb

**Figure 2**

JCO9 Rec'd PCT/PTO 24 JUN 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/5

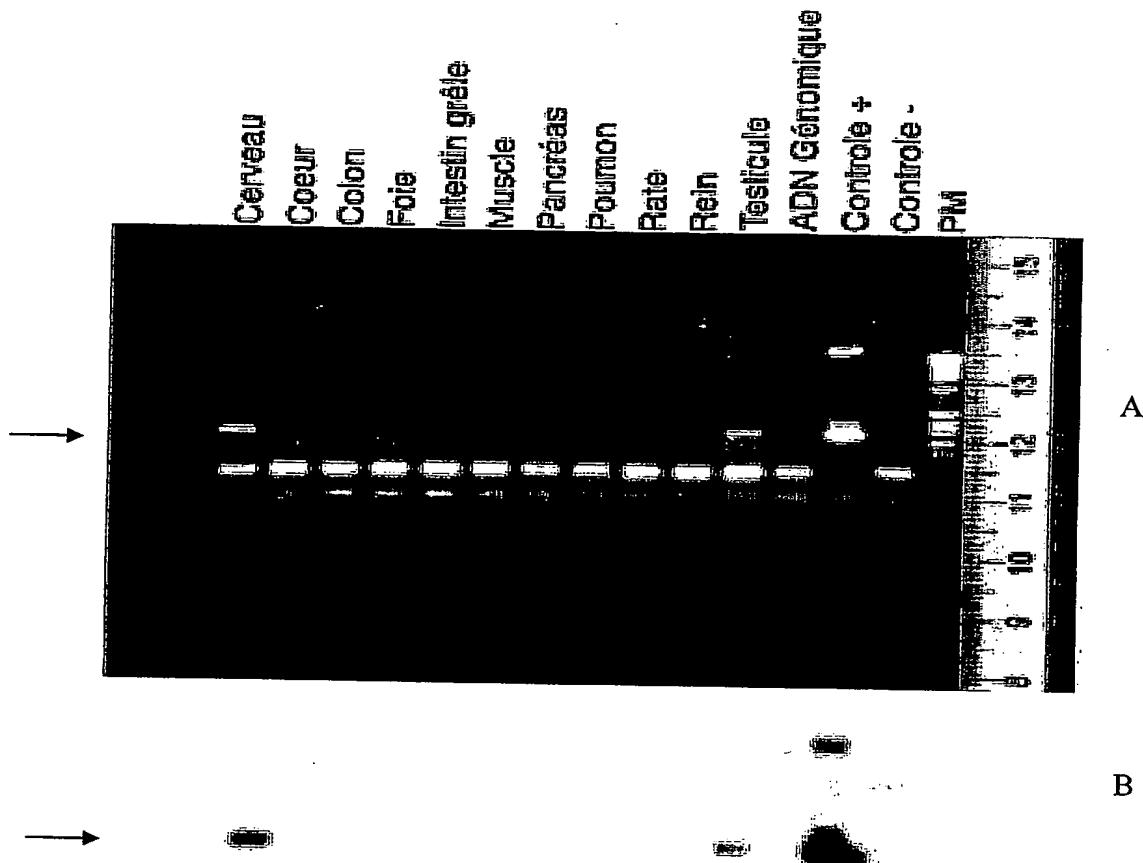
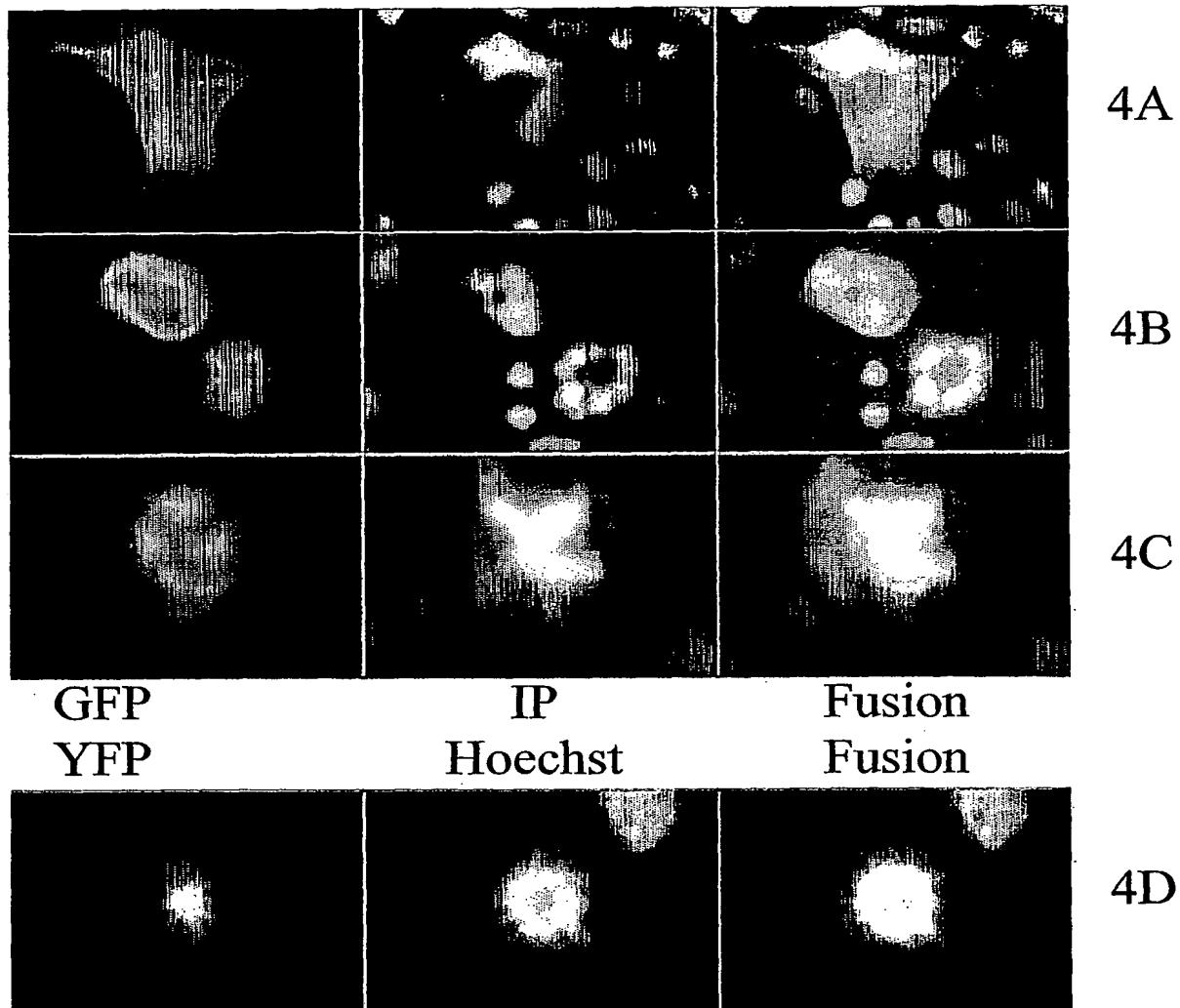


Figure 3

JC09 Rec'd PCT/PTO 24 JUN 2005

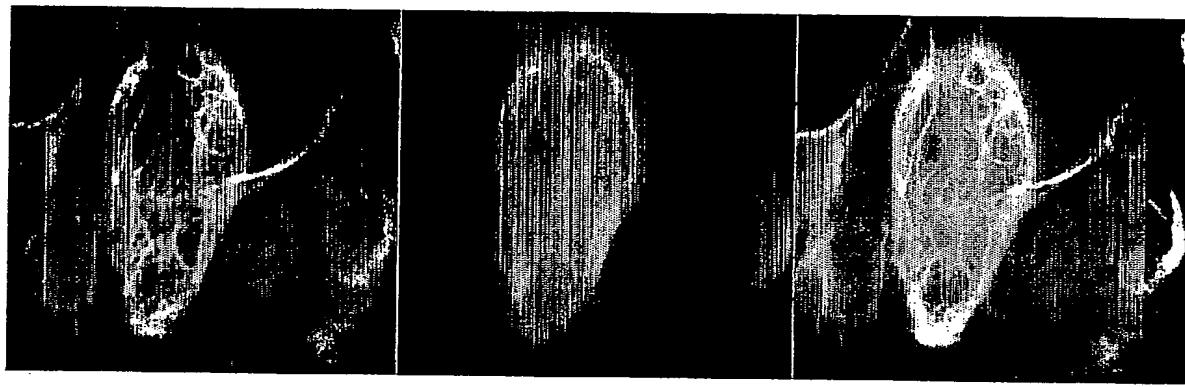
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/5

**Figure 4**

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

5/5



A

B

C

**Figure 5**

**THIS PAGE BLANK (over 100)**

s644PCT88.ST25  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

GIORGI, Dominique

SAFFIN, Jean-Michel

ROUQUIER, Sylvie

&lt;120&gt; Nouvelle protéine associée aux centrosomes et ses applications

&lt;130&gt; s644PCT88

&lt;160&gt; 53

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 647

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
1 5 10 15Lys Val Thr Lys Arg Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
20 25 30Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
35 40 45Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala  
50 55 60Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
65 70 75 80Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys  
85 90 95Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn  
100 105 110

s644PCT88.ST25

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser  
115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile  
130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu  
225 230 235 240

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe  
245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu  
260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn  
275 280 285

Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys Glu  
290 295 300

Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Lys Ala Lys Ala Glu  
305 310 315 320

Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys Ser  
325 330 335

Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys Thr  
340 345 350

Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg Ala  
355 360 365

Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser  
370 375 380

s644PCT88.ST25

Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu  
 385 390 395 400

Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile  
 405 410 415

Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp  
 420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg  
 435 440 445

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala  
 450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys  
 465 470 475 480

Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys  
 485 490 495

Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys Gly Glu Ala  
 500 505 510

Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu Lys  
 515 520 525

Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys  
 530 535 540

Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala Val  
 545 550 555 560

Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys  
 565 570 575

Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys  
 580 585 590

Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu  
 595 600 605

Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His  
 610 615 620

Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg  
 625 630 635 640

Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
 645

s644PCT88.ST25

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
1 5 10 15Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln  
20 25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser  
1 5 10 15Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe Asp Ser Asp Glu Ile  
20 25

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala Asp Glu Asn Ser Val  
1 5 10 15Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp Asp Glu Glu Lys Asn  
20 25 30Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys Ser Asn Gly Asn Ile  
35 40 45Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn Glu Glu Glu Met Ala  
50 55 60

s644PCT88.ST25

Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser Phe Ser Glu Ser Gln  
65 70 75 80

Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile Lys Met Lys Pro Lys  
85 90 95

Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
100 105

<210> 5

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
1 5 10 15

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
20 25 30

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
35 40 45

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
50 55 60

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu  
65 70 75

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ser Cys Leu Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu  
1 5 10 15

Gly Asp Ser Phe Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys  
20 25 30

<210> 7

s644PCT88.ST25

&lt;211&gt; 83

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Asp Pro Asn Glu Glu Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp  
1 5 10 15Glu Asn Lys Glu Asn Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val  
20 25 30Glu Lys Ser Lys Glu Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu  
35 40 45Lys Ala Lys Ala Glu Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro  
50 55 60Leu Leu Ser Lys Ser Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala  
65 70 75 80

Ser Ser Lys

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Lys Thr Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn  
1 5 10 15Arg Ala Ser Ser Ala Ser Ala Arg  
20

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser Ser Ser Lys Arg Arg Thr  
1 5 10 15

S644PCT88.ST25

Pro Ser Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu Gly Thr Leu Lys Val Leu  
20 25 30

Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp  
35 40 45

Asn Ile Arg Ala Ala Val  
50

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His  
1 5 10 15

Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln  
20 25 30

<210> 11

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp  
1 5 10 15

Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg  
20 25 30

Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg  
35 40 45

Lys Gly Glu Ala Leu Gln  
50

<210> 12

<211> 49

<212> PRT

s644PCT88.ST25

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu Lys Glu Lys  
1 5 10 15Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu  
20 25 30Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala Val Glu Lys  
35 40 45

Trp

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys Lys Glu Lys Ile  
1 5 10 15Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys  
20 25 30Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp  
35 40

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys  
1 5 10 15Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro  
20 25 30Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
35 40

s644PCT88.ST25

<210> 15  
 <211> 2575  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 15  
 acttccttcg tctgggtgg tgcggcagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttggta 60  
 cccgagagac ccggcggtgg ggaagtcact tcctccgaa gacgctgttt cctagcaacc 120  
 gcccctccgcc tctgttatta gcccctccctc ctcgctcggt ccaggaccgg ctctgcggc 180  
 gccgccaggc ccagaccaag ctactatcag aagttgaatt ctaataatta gctatttat 240  
 aaaggtaacg agaaaaata cactatgtct gatgaagttt ttagcaccac tttggcatat 300  
 acaaagagtc caaaagttac caaaagaact actttccagg atgagctaatt aagagcaatt 360  
 acagctcgct cagccagaca aaggagttct gaatactcag atgactttga cagtgtatgag 420  
 attgtttctt taggtgattt ttctgacact tcagcagatg aaaattcagt taataaaaaaa 480  
 atgaatgact ttcatatatac agatgatgaa gaaaagaatc cttcaaaact attgttttg 540  
 aaaaccaata aatcaaacgg taacataacc aaagatgagc cagtgtgtgc cataaaaat 600  
 gaagagggaaa tggcacctga tgggtgtgaa gacattgttg taaaatctt ctctgaatct 660  
 caaaataagg atgaggaatt tgaaaaagac aaaataaaaaa tgaaacctaa acccagaatt 720  
 ctttcaatta aaagcacatc ttccagcagaa aacaacagcc ttgacacaga tgatcacttt 780  
 aaaccatcac ttggccaag gagtatgtta aaaaagaaaa gtcacatgga ggagaaggat 840  
 ggactagaag ataaagaaac tgccctcagt gaagaattgg agttacattc tgcaccttct 900  
 tcccttccaa cgccgaatgg catacaatta gaagctgaga aaaaagcatt ctctgaaaac 960  
 cttgatcctg aggattcatg cttaacaagt ctagcatcat catcacttaa acaaattctt 1020  
 ggagattctt tttcaccagg atctgagggaa aacgcacatcg gaaaagatcc aatgaagaa 1080  
 atcactgaaa accataattc ttgaaatca gatgaaaata aagagaattc attttcagca 1140  
 gaccatgtga ctactgcagt tgagaaatcc aaggaaagtc aagtgactgc tgatgacctt 1200  
 gaagaagaaaa aggcaaaagc ggaactgatt atggatgatg acagaacagt tgatccacta 1260  
 ctatctaaat ctcagagtat cttaatatct accagtgcac cagcatcttca aagaaaaaca 1320  
 attgaagata gaaatataaa gaataaaaaag tcaacaaata atagagcatc cagtgcattc 1380  
 gccagattaa tgacctctga gttttgaag aaatcttagtt ctaaaaggag aactccatcg 1440  
 acaactacct cttctcacta ttttagggact ttaaaagtct tggaccaaaa accttcacag 1500  
 aaacagagca tagaacctga tagagcagat aacataaggg cagctgtttc tcaggagtgg 1560  
 ttagaaaaga aaaatgtata ttacatgaa atgcacagaa taaaagaat tgaaagtgaa 1620  
 aacttaagga tccaaaatga acagaaaaaa gctgctaaaaa gagaagaagc attagcatca 1680

## s644PCT88.ST25

tttgaggcct ggaaggctat gaaagaaaag gaagcaaaga aaatagctgc caaaaagagg	1740
cttgaagaaa aaaacaagaa gaaaactgaa gaagaaaatg ctgcaagaaa aggagaagca	1800
ctacaagctt ttgaaaaatg gaaagagaaa aagatggaat atcttaaaga gaaaaataga	1860
aaggagagag aatatgaaag agcaaagaaa cagaaagagg aggaaactgt tgccgagaaa	1920
aagaaagata atttaactgc tggagaaaa tggaatgaaa aaaaggaagc tttttcaag	1980
caaaaagaaaa aagaaaaat aaatgagaaa agaaaggaag aactgaaaag agctgagaaa	2040
aaagataaaag ataaacaagc tattaatgaa tatgaaaaat ggctggaaaa taagaaaaa	2100
caagaaagaa ttgaacgaaa acagaagaaa cgtcattcct ttcttggaaa tgaggcactt	2160
cctccgtgga gccctccaag cagaactgtg ttgcggaaa tgtttggata attctagttc	2220
ttacattatt tggattttt tcggttgc aatattagcc atagattaa accattcaat	2280
tatattatgt tagaggaata tattttattt aaatgccaga cactcctgct gacaatgaaa	2340
gaaatacttt ggaatgtaat cagtggaaagc atttttttga actgttagata aactgcctca	2400
aacaaagacc taataatcag attgtttta ccattaagat acataagatt ttatcatgtc	2460
ctgataattc ttatggggaa gtgattcatg atcttttca ttaagctctg tatgttattt	2520
aagtatattt aattccagta ataaaaagga aatcatctag gtaccataaa aaaaa	2575

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 29750

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 16	
tctgggtggg agttggcgg gtcctgtctc ctaggcaaca gcacatgcac acaagcgacc	60
aataatgagc ccctctccaa agacccagga aggtgatgtc acttccttcg tctgggtgg	120
tgccccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgtggta cccgagagac cggcggtgg	180
ggaagtcact tcctccgaa gacgctgttt cctagcaacc gccctccgcc tctgttatta	240
gcccctccctc ctcgctcggt ccaggaccgg ctctgcgggc gcccggcaggc ccagaccaag	300
gtgagcagct cctaccgat gcttggctct tgattctcag ggtcgccggag aactggccgc	360
ggcggtccgg ggccgggaac agaaagcggg acctgggggc catggggat ccggacagag	420
accgcgtttg gacgtgcacg ggcctggcgt tcgctggtc tcagcatacg gcgcggtag	480
gagcggcgag caccggacg tcacctggcc tggtagggaa cggAACCGG ggcgcacaac	540
gctatggcg gccctgccag gcctctgctc cgagtacggg aaaccgcgtt ttaatgcgg	600
ctcatcgca aagcttcgtc gtttgcgt gctcttttta acactttgt gagagaaaa	660
attggcttgc aatacatctc gctggctgtt tgcgggttag cattacgatc ttttttttgc	720
aatagcgctg tatgcaaata tatagataca tttttttt ggtgggtggc ctcataattt	780

## S644PCT88.ST25

ttacggcgac gatcctttt atggcctttt aaataagacg tgacttattt tgaaggcaat	840
gttatacttt agaagagagg tgaaaaataa ggtgttctat tttaattggc agcattttgt	900
cgtattaact tgtaatcatt tatttgcaga ctttttaagt agttgcaaaa ctattttagg	960
ataacttcca tttgaatttt tttaaacaag cttgttatga gaatttgcta tttctttaca	1020
agaacccttt taagtgaaga tgtagccaa tggtcatatc agatgctttt ctttgacctt	1080
tgtggggaga gtagaatcaa atgtaataaa ataaattctg aagcatgcga agtctgattt	1140
gttttgtata tttcagctac tatcagaagt tgaattctaa taatttagcta ttttataaag	1200
gtaacgagaa aaaatacact atgtctgatg aagtttttag caccactttg gcatatacaa	1260
agagtccaaa agttaccaa agaactactt tccaggtaaa gtatTTTtat ttggaatcat	1320
ttcacagtgt aaacactgta ttagatgggt tgaaattgggt gattctagaa cagtcctata	1380
taaagcaggg gtaaatctta tattactttt gaggtttgc acatgatcat gtttgggctc	1440
catccagtttatacaactcc cctatatggt tttaagacta ccaaagttagc ctcaataacta	1500
gtttcctact aagttaaaag ttgaatcgca accttaaattt gccatttttataaaaaact	1560
ttttttctg ttgtacata atgttaagt tttttttct gttgagtcac tgcaattttt	1620
aactcagcct ctaagtttgc aatattgatt gcatccattt ctgaaatatg ccgagacaaa	1680
agctcttaaa aataccaatt tctttcaaaa taccagttt taataaatta taatctaaat	1740
tgagccccctt cttatTTGTT accctccagc tctaattata acctgcaatt aatttggcc	1800
ataatgtgtg tctcctctag ttAAactgCG agctccatga ggaagggctc ttgtctgtga	1860
tgctctgcat tgagtatgag gcgtaaagtg ggtacatggc ataaagttag cttgcaggaa	1920
atatttggta gatgaatgaa acctaagttt gaaagcagtc gttaatcaag cattgtttgt	1980
ttaaagaatt acttgtgaat atgatacctc catgtttgga tggaaattga tttcagtatc	2040
tcatttcagg atgagctaat aagagcaatt acagctcgct cagccagaca aaggagttct	2100
gaataactcag atgactttga cagtgtatgag attggatgt gacagtatgg aaacgtgaac	2160
cactttctt cttttgttt ctttagttt gtatTTGCTT agccccccaa ccacccatcc	2220
cctcaatcac gtatgttaaa ataataccta agcatttact aatttttagat tttcaacttt	2280
ttaatttagta gaaagccact cttaattttc aggaagttgt atgatTTTCTT ttttttattt	2340
ttgtttgtt ttctgaatgt gtatacgaaa atataaatta attgtatggca ggtttgcagt	2400
aaaaggatgg ctgcccagtgg taaaccacat tgaagaagac aggttcatct ttaagatcaa	2460
ccctaggagg tgctacagct agtttagtaac tagtcccaca gaactaaact tcgggtgcaca	2520
ttagaagtgc ttttataaag cttgtataa atcagatTTT tttggctgt gataaggggt	2580
aaatttaaaa accacagact ctgcgtttt catatatcag tactattata attgggtttc	2640
tcttagctat gtaaacatata taacattttt gtttcaggta taagcataca gaattctaaa	2700
cttgggtgttt ttgtttgttt gtttttgggtt ttgagatgga gtctcgctca gttgctcaag	2760
ctggagtgcgtt gttgggtgcataat ctcggctcac tgcaacctcc acctcccagg ttcaagtgtat	2820

## s644PCT88.ST25

tctcctcctt cagcctcctg agtagctggg actacaggtg cccgccacca tgcccgctt	2880
atttttgtat ttttagtaga gatggggttt caccacatcg gccaggctgg tctcgaactc	2940
ctgaccttgt gatccgccccg cctcagcctc ccaaagtgtc gggattatag gtgtgagcca	3000
ccgcacccgg cctgggtgtt tattcttaa aatttggtaa ataattgtaa ttgatttctg	3060
taaaaccagt aataaccaca gttaaatcac tgctgtatag ttaacttagc atttctttag	3120
attcttagta aatctaatac tctgggtgtgg atggaattgt agttccaaaa ttttatgga	3180
aaaaatataa ttagtaatta ctaattaaat tcttccattt acaaatgttc ttgattttac	3240
atgaagaagt aatttgc当地 aaaaagttt acagtc当地 atctaattta aatgctacat	3300
gactgattgt tagggacctt tggatggctt tttccagagc aaacagtgtt tggttgggg	3360
gtaccctaca gacaacacaa taaatacatt ttgaataat taatgaaatt ggaattttta	3420
tttcataat gttaatgaga cgtgc当地 tagtgc当地 ttttagagct gcaagtctat	3480
ttataaaata catttgc当地 tattcattgt tagaattttg ttttagctt ttaaggtaaa	3540
cttgattaa gttAACGtaa ccttgc当地 tttaaaaat actgttggaa acattttct	3600
tttccatttt tcagttctt taggtgattt ttctgacact tcagcagatg aaaattcagt	3660
taataaaaaa atgaatgact ttc当地atc agatgatgaa gaaaagaatc cttcaaaact	3720
attgttttg aaaaccaata aatcaaacgg taacataacc aaagatgagc cagtgtgtgc	3780
catcaaaaat gaagaggaaa tggcacctga tgggtgtgaa gacattgtt taaaatctt	3840
ctctgaatct caaaataagg atgaggaatt tgaaaaagac aaaataaaaa tgaaacctaa	3900
acccagaatt ctttcaatta aaagcacatc ttc当地tagt tactgtaatt	3960
gcatttcttgaagtttatt ttaagataat cagtc当地aaa attttatat ggtagcttagt	4020
atataatttaa gaaaaaaaga cagacttaac ttccattttc cagacctgtt gtattttgtc	4080
taacattcaat tttacagacc tgggtgttatt tgc当地actt caattttaca gacctgtt	4140
atttgtctt gcatctaggc tgggtgtgaa tagaaagcca aagcacaag ccaaagcacc	4200
tttagtcatc catagcatcc atagctgtgg atctccagac accttagaccc gtgagcttca	4260
gtttgtttt taggtgtgaa actggatgg aatgctgtct aatccctctc acactccaaa	4320
gattagagtt acagcaatat tgagactaat ctttcaaca gtcttgc当地 taccacatt	4380
gtgccc当地 attttcttga catttgc当地 tttgaaggat gagttatgtt attgctgtt	4440
ttgtttgtt aagcatccag gcaactc当地 agagaatctc catttgc当地 ctgtattgc当地	4500
tatgaaaatc tactaagatt cagtttcca aaggaaagtt cctgggtgtga tctgggatta	4560
cagtttagttc tgccc当地 atttactgaat ttttaagcata aaggaacaaa gatagaatga	4620
aacggagacc aagtccgtc acataccctg ggccaccatt catgaacttgc tatatgcaag	4680
gttaaggatt tttgtttt catttgc当地 attttataaa ggaatttataa gttgatgtt	4740
accttc当地aa aatcttccctt gcatatcatc agtaaataca gtgctggtaa atatttcaata	4800
ctttgc当地at tagataccag tggtaacgtc agacaaaact ttatccagg catgtattgg	4860

## s644PCT88.ST25

ggaaactgctc	ctttcttcct	gaccccacaa	tctcattaac	tttgaatga	gcaaaggatg	4920
taagcagagc	aaagaacact	agaataatat	ccaggacact	ggggaaagg	cctctgtata	4980
ttatatatga	cttcagcaaa	taagttaaagc	ttcagtatcc	tcatgatgag	gaagctaaaa	5040
ataaccctct	ttctattcct	gcaaaattgt	gagagttat	tgaagtgc	ctcataaact	5100
ataaaaaact	acaaaaatgc	aaacagatgc	ataatgaaac	aattaacttg	ttaaaatgt	5160
ccttctaagt	atagtgagtg	aatcaatgc	tggagagaag	aggaacataa	ttgaacttcg	5220
ttattaagaa	aatgcgagca	tatatagcaa	ctaaaaattt	gtctgagaca	ggtggatgt	5280
tataattaga	agtttatggt	agataatcag	gaaagcaata	atccacctat	ttcatacctt	5340
aaaaaaaaaa	aaaacctgtg	gtgggttaca	atgaataaga	aaatactgt	tttaaccac	5400
aaggtggcat	caggatccta	aatgctctac	ttatataatgc	aatgttatat	tcagtacgt	5460
taatataaaa	ataattacct	aaataggtaa	ttgtatacat	tgattaccaa	aaaaagcgct	5520
tttcttaaag	tataggcatt	ttttttctt	tttggaaact	tgacagtact	tctgaaagt	5580
gaattttgt	agaaaatata	ttaaagttgt	cattctcagg	ttcttcaggt	tgaaaagtaa	5640
aaattgaggc	tagtgttcct	aagataatat	ctggcatata	taataagtat	ttaaatgaat	5700
aaattaatat	atgaatgatt	tatcttgaa	agagggata	tggttcatga	gtttatcctc	5760
taaattcttt	gactttttt	tttctgtac	aggttggaa	ctcaatgttt	ttaatgtggt	5820
gagatattgc	tgagtagcaa	gtaatgcttt	atgaaactat	tagagcttga	aggtttctc	5880
tgtccttgct	tgtctttgt	aaaaagtata	ataaccagac	tttatagtca	ctactgaagt	5940
gacagttgct	ctataaagtg	aaagtatttt	tcacaggata	tgttttatt	ttaatactaa	6000
catgactgaa	atcatgaact	ttggagtcag	gatgcttc	ctttaatctg	agatctgcag	6060
cctgctagag	tttgtgactt	tggcatgag	acctcttgt	tctcatttta	ttcatcttta	6120
aaaacgggat	aatagttgcc	tgcccttagg	agtttgaggc	aattaaatga	gttcacatata	6180
ttgaagtgct	tagaatagta	ctggcataaaa	tttagcactc	tataaatgtt	ctgattattc	6240
attttattat	ttagcgttt	tttataaaca	tgctcagcag	gtataaaagta	tcagtc	6300
gggatgcgt	agttctagag	atctgctgt	cattgtgcct	atagttaca	gtactgtctt	6360
ttgcactgaa	tgtattaaga	aggtagatct	catgtttgtt	cttaccacaa	taataaaaaaa	6420
aattgactca	acaccttctt	tcaggcatta	tataatattc	tgcttaaact	gaggctaaaa	6480
agacatgcaa	gcatttgc	ggaggagaag	caggaagtgg	atattctagg	cagggggatc	6540
agcttaggt	aaggtatggt	agcaggaggg	attggaggg	ttgtggat	tgtgc	6600
aactgttagc	ccagcatttc	agaaacacag	atgacaaaat	ggctgtagat	aaggcagt	6660
aggacaaaac	cataaaatcc	gttttatgtt	gtttaaggc	agttaagctt	ttattctgt	6720
ggattggatc	atggggagcc	attgaataat	ttttagaaaa	ggagtgtat	gatctgattt	6780
ggattttgt	aatatcatgg	aagcagtgt	ctaggaaaga	gtggataagg	acccgacagc	6840
aggatgttag	aaagtggaaat	aatgagata	tttggcaatt	agaattgata	ggatataattg	6900

## s644PCT88.ST25

atactctgga	tttagggat	aatagaggg	ggaatctaga	gcccttggat	ttggggttga	6960	
acatttggct	ggagtttagg	atgttagctaa	aattgtcagc	tacttataat	aataccaatt	7020	
tggtatggtt	gtggaatctt	ctggcagaat	ccataagccc	attttttagt	aatgggagg	7080	
aagatgttaa	ttagaccaat	tttgaagttg	agaaaaatgc	atttgtagaa	caatagaaac	7140	
ataaaatatgt	atagcaggta	aatgcaggc	aaaaaatata	tacatggaaa	gtcttcccat	7200	
tgtttcgaat	actggatgca	aatcagcatt	tgattcttga	tttaaactta	gaagtaatgg	7260	
aaagagtgaa	attttaataa	atgctaaaga	agttttatgg	actcagaaca	atthaactcat	7320	
aaaagattcc	ttcctcta	at	gagagttgc	actcctatcc	cttggatgcc	7380	
tctttgtcct	tataatagca	cttataatct	tagtaatcta	gtcttgtaat	tttggtaga	7440	
aaaatcaacc	tgtaaagtac	ctggacaggt	ccattgccgc	tttggatt	atgaggttt	7500	
gtaacgtgta	cagggcttgg	tactcaaagg	cttggatggat	gagcctcctc	attttatagt	7560	
ggtagaaact	ggggcaagat	tttgggggt	ttttttat	ttaacattt	ttttttata	7620	
ttataagagt	tcacaatgtt	gaagagttaa	cttcttgta	ctgggtactt	tcaggatgac	7680	
aactgtttct	ttactttgtt	tttttttgt	tgttggtagt	ttttggtttt	tttttttttt	7740	
tttagatggat	tttgctctt	attacccagg	ctggagtgca	gtgggtgtat	ctcgatctcg	7800	
gctcactgca	acctcagact	cctgggttca	agcaatcctc	ctgcctcagt	ctcctgagta	7860	
gctgggattta	caggcacg	ctactaagcc	cggctaattt	ttttgtat	tttagtagaga	7920	
cagggtttca	ccgtgttagc	caggctggc	tcgaactcct	gacctcatga	tctgcccacc	7980	
tcggcctccc	aacgtgctgg	gattacaggc	gtgagtcacc	gctcccaaca	tgtcgggatc	8040	
acaggcgtgta	gccaccgcgt	ccggcctgat	tattaaccat	catttattt	tgccttacta	8100	
gagctctgta	tagagaagag	ttgtgggctt	catctggact	cttcaggaca	gagaacaaag	8160	
gggcataggc	acaggaggg	agtatggtag	cacccagaga	gatagataaa	gccatggtca	8220	
ttttttata	cacacactt	aagcatttta	ttttcagca	gaaaacaaca	gccttgacac	8280	
agatgatcac	tttaaaccat	cacccggcc	aaggagtatg	ttgaaaaaga	aaagtcacat	8340	
ggaggagaag	gatggactag	aagataaaga	aactgcctc	agtgaagaat	tggagttaca	8400	
ttctgcacct	tcttcccttc	caacgccc	tggcatacaa	ttagaagctg	agaaaaaaagc	8460	
attctctgaa	aaccttgatc	ctgaggtag	cactaccact	aaactgttga	attgtgttct	8520	
tgaattttag	ttttttatc	tgattatgaa	aaagagaagg	agagaatgaa	tttgggtgcg	8580	
tgtgtgtgt	ttttacatac	tttcttctgc	aactgataag	gaaataattt	ttaaaaatac	8640	
actgtattcc	accgagtcta	aaactgcac	aattgtaga	cgtgcattt	ttttacatac	8700	
cactaaggaa	gaagggaaatg	catccaatta	aactataaca	caccagtat	tgttagagtt	8760	
atccagttt	agagaaagta	aatgtcaaa	aagtgttgct	tttctgaatc	tatataatag	8820	
tgtttatctt	taataat	ttaaattt	gtatcttga	attatgtat	ttatggctaa	8880	
gaacaatata	gtcagtgtca	ttttat	ttgat	ttt	tcactcaaca	aatgtgtgtt	8940

## s644PCT88.ST25

gaatgttcat ggcactcttc tgtgttcttt	gggttatgtt ccaatagcat taaatgtggc	9000
cttcagggtt tccatcaggg aatttactat	gcattgttat taagggagaa cacttcgttt	9060
ttctctttgt atttcactat gagaagcaaa	ctgtcccttc tgaacatttc agaaggaaaa	9120
agtacaggaa gaacatttct tccccataat	ctgcttgggc agattaggaa actgcattgcc	9180
acctggccaa gcttcttct ttttctcatc	gcttgtctgc agtgttggtg cttaggatc	9240
tgctctctgg gaggtgagggc agaagggtct	gagaggagct cttttgtca atgactaaat	9300
gggggaatcc ccctaattca gacttggagt	attaggaagc acaataggct accaattcaa	9360
atcttgttct gcagttgagc tttaccagta	aagctgacaa tttgatatac gcctaactga	9420
caccaccatg ctgtttctta atttgttctg	aaaaccagaa gaagaaaccc aagcaaatac	9480
tttatattta agaaaattat ctgatccatt	gaatattgtg cttagttctt gtagctgctg	9540
taacaaatttgc acacaaactg gttaacttaa	aacaacagaa atgtattctc ttagttctgg	9600
aggtcagaag tccaagatca aggtgtttgc	agggccattt tcctctgaag gcatcacgga	9660
agaatccttc cttgcctctt ccagcttctt	tctagtggtt gccagcagtc catggcattc	9720
cttggcttgc agctggcttgc tagctgcattc	attcccttct ctgccttcat cccatgtggc	9780
cttctccct gtgtttctc tgcattgtctg	tgtctcttct ttctcttaaa aaaagacacc	9840
aggcatttggaa ttttagggccc accctaatttgc	agtgtgtcct catcttatct atttaaagct	9900
gtaaacacct tatttcctaa gaaagtcgtt	ttttgagggtt ctggatgaac atgaattttg	9960
gggcatttaat gttcgatgt taaaccttagc	attcccccggaa taaactctgg ttagtcatgg	10020
tgtgatattt tattgtggaa tgcattttgt	taaaattgtt ttaagggtttt catctatatt	10080
tatgaagtctt attggctctgt aatttttttc	ttataatgtt accatcaggc ttgggtatca	10140
aatgagttgg ggagtgtctt ttcttcattt	tataaaagtt tggatcatt attttcttaa	10200
atgagaggat tcaccagtttac aattatctgg	gccttggatt ttctgtgtgg agacatctt	10260
ggcattacat ttgattttttt aaataggat	ttcagttactc acattttctg ttttgcagg	10320
ttggtaatttgc tgcattatcaa gaagtttgc	catttcatttct gatatgttga gtttataaac	10380
agagttgttc acgatagttcc ctcatctttt	tgcattttttt tgatgactag gattatcatg	10440
tttatttctta acatataaa tttgtgtttt	gtgtctttcg tgctaaatct tgataggcat	10500
tgcttagttt tattaaacgt ttttaagaac	catttcggct ttgtcatatg ttgggtcaaa	10560
agtaatttgc gttttggcca ttactttcaa	tgacaaaaac cgcaatcatt ttgcaccaac	10620
ctaataattt tctctattgt ttgtttaatt	gattttcaatctt attatttcatg tattattcag	10680
tattatttct tttactttct tttttttttt	ttgagacaga gtctcgatct atcgcccagg	10740
ctggagtgca gtgggtgcaat cccagctcac	tgcaagctct gcctcccagg ttcactccat	10800
tctccctgctt cagcctcccg agtagctggg	actacaggca cccaccacca tgcctggcta	10860
atttttgtat ttttagttaga gacggggttt	caccgcgttta gccaggatgg tctcgatctc	10920
ctgacatcgtt gatccaccca cctcggcctc	ccaagggtttt gggattacag gcgtgagcca	10980

## s644PCT88.ST25

cggcgccctgg cctctttac tttctttgg ttaattgc ttatcttag atttgaat 11040  
 tttctcattc attttaaga tttcgtat ttctgctaaa cctgttggaa ggtgtaaact 11100  
 ttcttcttg tactgctta gtggcccgaa tttttgatg ccttttattt ttattatcat 11160  
 ttcttaaat atatattta acttcccttg tgatctcctg tttaaaaat ttatttttt 11220  
 agttaaaaaa taataattgt acatgggta catagtattt tttcgataca tataatata 11280  
 agtgatcatt gtgatctctt tttgaccag ttggttattt tatggtgatt tattttattt 11340  
 tcaaatactt gtttttctc tagatatact tttgatgtt attataagtt aattttgtt 11400  
 tagtctagag aatgtatctt acatgatttcc aaattttaa aaatttattt tattttct 11460  
 aaatggccca gcttttagtgt atcttgcata agtctcattt gcatctgcaa agtagatgt 11520  
 ttctccagggt gttgaatata atgttgcata atttaagttt ggtcaacatg gttggtaata 11580  
 tcattcagat cttcttatac cttactgatt tttcatccaa tttgttacc cgttaccaac 11640  
 ttaggggtat taaaatatcc agttatgttt gtgggttgc ttatacttct ctttagttct 11700  
 gtcagtattt tataactttg ttatcaggca catacacatt tattattt atgttttgag 11760  
 cattatgaaa cgtctctacc tctggtaata ttccttcct tatctttagt attgtttgt 11820  
 gtaataacttc agcttctta tgacaagtgt ttccatggta tatgctttct atctttttc 11880  
 tttcaaacta attctgtctt ttcatgtaa tgaatctctt acaataagag tttgggtca 11940  
 ctttttattt aagtctgaca atctatgcct ttaatgttag tgtttagtcc atttatgaat 12000  
 gttttgtcca ttaatgtaa atactgctat gattggattt aggagcaatt tggtctt 12060  
 tattttctat ttatctgttt ttaaaatattt ttgttttattt tggtttctt ctgttactcc 12120  
 tttcttgccct tttttgagg agataatcat gaatcttta gtttttattt attattgacc 12180  
 ttttatctat atttgtttgc attgtatttc tcagagttga tcagtggtt acagaatata 12240  
 tctgaaaatt atcacaatct atttagaatt gatattgtat tgttcacat ttgatctaga 12300  
 aaccttgaa taatatagtt ccatatactc cctcatccat tgcatttttgc tcatatatta 12360  
 tatctacata tcctataatc cccacaatag agttataact tttctttaa gagcccttc 12420  
 agtttttgc attagacttt taaaaatattt aagaaggcta gaataaatat atattatata 12480  
 tctactgtat tatataattgt atatattata gataacattc tattgctaaa tatagataat 12540  
 atatattgt agacaatatc tatataatagg taatataat tctattctt tatattatata 12600  
 agatataaa catctatata atctatttata agatattaca tatctataaa tacatataca 12660  
 atttcttaggg atcttcattt cttcctgtat attcagatta ccattttgtg tcctgtcagt 12720  
 cttacaaact tattttacat ttcttgtaat acaggtttac tagtgatggaa tttttctcag 12780  
 tctttgcttt tctaaaagta tttgtctcat ctttgttttca aatgggttgc tgatgtgatt 12840  
 gtattcttct tgcattacag ttgccttctt ctaccccttgc ctctttatag gttccattt 12900  
 ttattggcct ctcttgtaat catttcatttc attgtccctt ctatataatg tttgtttttt 12960  
 gtctgaatgc tgtcaggaat ttactcaag attgtgggtt ttatcttttgc attacagcaa 13020

## s644PCT88.ST25

tttgactgca tgggcctgg gtctagctt ctttatgttt attctgcttg acgtttgtt 13080  
 agctttccaa acctataagc tgatactgtc tgtgaaatgg gaagattgtt atttcccacc 13140  
 ctattttca tcctctccctt ttggtactgt agttacacat gcattgaaat ttgtgctata 13200  
 tctcactgat ctctgagatt ctgttataat ttcttaaatac tttttccctc tttgtttta 13260  
 agattgaata acttgttatta cttagtcttc acgtttacag attgtggtcc ggagaatgt 13320  
 tctttatga tttcaaattt tattaaat ttttgggg ttttaatggc ccagcaaaag 13380  
 ggtatgtcgt gagagttcca tttgcagttg caaagtatgt gtgtttcca ggtgaatttt 13440  
 ttatttcact tattgtgggt ttcaacttca gatttctat ttgttatttt tctgttttt 13500  
 aatataaaaat cccccatctt ttcagccatc atgcataat tttccccaaa gtgctgaac 13560  
 atatttataat tagcttattt aaagtccttg tctgctaact ctaaaacgtg agtcatctc 13620  
 gggttgggttc ctattgacca ttctctgtt ttttatttt ttttttaaat aagtgtcacc 13680  
 attttctgtt tcttttagtga ctttgattt aataccgggt gttctgaatg atatttgt 13740  
 gagattctgt attctttat gtcccttcaa acatatttc tagcaagtgg atatcatggc 13800  
 tggacacaaa ttcccaatcc ttttctcct gcagtggttca tcagctgaaa tttctgctt 13860  
 attctttca gtttctagct tctatgttt tacaggatcc tctgaggctt cccttatgcc 13920  
 acaaataagag gtggtaaagg ttttgggtga atttcatatg cagattttgt ggtcaactgtc 13980  
 ctctgctatt ttccacatc ttattggctg atctgatggt cctagactca gtccccgtt 14040  
 ccctcaagtc attccaccaa ggctgttagcc ttctattact tgagctgcat agactggaga 14100  
 atgccttctg gcaaaaagct actaatttgc agatctctc aggtgaagct ttatcttca 14160  
 gggtagactc cagtgtctca gcacttcttc cattttctca aatgtttctt ctccattgt 14220  
 tttgacatat aatttcctt gcacccataa aatactgcgg agaaagaaaa tttaagtatt 14280  
 tgtacaacaa agttgaactt cctacattgt aatatcatta cctttaggct agatgattct 14340  
 atgaagaaaat gtttacctt gatagacaaa tataatttt tcatatcaga tagaattttc 14400  
 agaattttga gggaaaactca agtgcatttca atctatgtgc ttttcctatc taaaatattt 14460  
 ggaagtagcg gcttacttga ttttattaaa tgctttcatt tggtataacta gtaatattt 14520  
 cttggacta aagtattttt cctgtcttct ttatgctttc cttcaaagga taattgtagg 14580  
 aagagctatc aaaatcaaattt cttggcctt aatatttata agaaatgtga ttattaaagta 14640  
 ataggagttt tgaaaattgg taaaaataa atagagaggt ggtggtagtt aaagaacttg 14700  
 aataactctt tcagtgcaccc ctttaatgtc ccaagacatc aaggcttcaa agtaaagcat 14760  
 gcttacctcc attggcttgc cacactttgc gtttcagcaa caaatgccta aataatgcag 14820  
 atttcagagt tatgcactat ttcaatttgc agtttaata atgctattgt tccctataat 14880  
 gttaattttt aaacttatgt ggcaaatgt 14940  
 aacaagtctt gcatcatcat cacttaaaca aattcttggaa gattctttt caccaggatc 15000  
 tgaggaaac gcatctggaa aagggtggta tatctaataa ttatatctt tatgtgaact 15060

## s644PCT88.ST25

ctgtactact tagactcctg tttgttaagag aaataatact ttgtatagtt ataagagaaa 15120  
 tataatgtttt tatgtgtttg agtttaatc ctgactatgt agttaactaa ctgtgatttt 15180  
 gcatgcagaa cttaatctct cagtgcctca atttccctaa gttatattat ttgtctcata 15240  
 aggttattgt gaaaattaag tgatatagtg cattttagcc attagcctag ttaatagccc 15300  
 aagtggagtg agcacttaag gtaaactact gttatgtatg tggctgtg atattctgca 15360  
 ggacaacata atagcttagt ggaattttaa agtgagacta agctagattc caatacaggc 15420  
 acaattacat aagcaaagta actaaccttt ctgaccctgt atgttgatct ttaaaaatggg 15480  
 taaaataaga gtaatttgcc ttatagggtg ttgttaagaat taaacatgta aagcatttac 15540  
 agcaatacca tagtaagcac ttgggtgtat atgtgaattt gtaacataat ttctttctt 15600  
 agtgatacgt agcttaatga aacctaaaag acatagctat ttcttaggtct gagatgtgta 15660  
 atgaacattt tagtgcttac tatgttagtat cattttgtc attttacaga tgagaaaagc 15720  
 tgaagtgcag tgacttaggg aaacataccc aaggtcagtg atggaaccat agttaaatct 15780  
 ttagttccaa agttcttgtt ctttcactg aacagattaa cagctccaaa gaatccaata 15840  
 gtgaattgag tgattttaaag cccatgttac ctcaaaacaa attccaaaaaa aatggtcata 15900  
 atgaaaccaa cagaattaag acttttcaca gtaaagattc aggttttagct gcaaggtgga 15960  
 cgttggtaga actgaaagtt ggtgatccca ttccaaaatg tggtaaaatc agaatagtag 16020  
 aagcaattct ataaatgcaa aactgaatct tcttatgcca gagcttgagc ctgtttctt 16080  
 gagcactgag aggataagca ataggcttgc ctttatggta tcagaggaag 16140  
 tactacatct tggtgagatg aaactcacta gagactgtgt aaaattgcat taattcttgg 16200  
 ttctttctgc agctatacaa ttcaacaatt gtactactag taactgttagt agcctagaga 16260  
 ggtgtgacac cttcttatgc agcgtgttgt tccagctaag aaactcaggc ttttaggtta 16320  
 aacaaatatt gtcatctcac ttacttggtt tgtatataaa caagctctt tgacatgtcg 16380  
 ttgttttagg gtagttattc cattctgttt attaatatgc tattttctt agtactagat 16440  
 ttgttaagtg cttcatttagt taagcctaga ctatttttt ttgttaaatca ctttcgaaaa 16500  
 gagtttatgc aagttaata tgataacttt tcttcattttt ttgcaagaaaa aaagagttt 16560  
 tagatagtcc tcattttaaa gaaagcaaat gaatcaagta tttaccttta taattcagaa 16620  
 gggggttta atgctattac tctgtctcaa aatagatcca aatgaagaaaa tcactgaaaa 16680  
 ccataattcc ttgaaatcag atgaaaataa agagaattca ttttcagcag accatgtgac 16740  
 tactgcagtt gagaatcca aggaaagtca agtgactgct gatgacctt aagaagaaaa 16800  
 ggcaaaagcg gaactgatta tggatgtga cagaacagtt gatccactac tatctaaatc 16860  
 tcagagtatc ttaatatcta ccagtgcac agcatctca aaggtattt taaaattca 16920  
 tactttcat actacagctt aaaacttcaa atagaacttt aagaaatttt atcttctgtg 16980  
 ttatataactt ctgaattacc agtggaaaat ttatctttt atagtgtat tggatgtca 17040  
 catggttctt acttaatcca ataaaattt aacttaagga aagttttagt tgaatataat 17100

s644PCT88.ST25

gaaaccagg tttttttttt tatcagaggt gtgtgatcat aatatacttt taaatgtctc 17160  
agaaaatgcat actcatagtg tatatatattc cataggtctt catatttaa aatataact 17220  
gtctggaata atttctgaga ttttaaatta gagttatgtt tttggatatt gttttaaaac 17280  
gtgttaacaa ttttaacaaa aatcttaaag aatgtttat caacagttt tcaacatctg 17340  
tgcttcctta aatagatgg ttatcatcg gaacattagt attattattc gtatttgatc 17400  
ctttgccttt atttcctaattttcaaaaata atgaactggt gccctggcaa cctccagagg 17460  
tgatgaagtt gctttgttt ttctttttc aattcatgtt aattttatgg ttacaagtgc 17520  
tttttgtta catggatata ttgtgttagt gtaaagtca gacttttagt taaactaaaa 17580  
tgtacattgt acccattaag taatttctca tcccgacact ccctctcacc tttcctagtc 17640  
tccattatct attattccat accctatata catgtgtaca cattattnnctt ctctgacttg 17700  
taagtgagaa catgtaccat ttgactttct gtttctgatt tatttcactt aaggtatag 17760  
cctccagttc catccatgtt gtaaaagata ttatttctt tctgtgtggc tgaatagtat 17820  
tcctgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt atacacattt tctttataca 17880  
atcatatgtt gatgtacact taggttgatt ccatatctt gctattgtga ctaggggtgt 17940  
gataaacatg agtgcaggta tctttttat ataatgattt atttcctt tggcagatac 18000  
tcacagtggg gttgctggat tgagtggtag ttctatattt agttcctttaa gaaatcccc 18060  
aactattttc cataaaagatt gtactaattt acattcttac caagagtata caagcattcc 18120  
cttttctctg tgttctcacc aacatctgtt acttttttaa ctttttaata atagctaaat 18180  
attctgacta gtataatata tctcaactgtg gtttaattt gtgtttctct gatgatttagt 18240  
gatggtaac atttttttc atgtttcttg gccacttgta tgtcttctt tcaaaaagtc 18300  
tattcatgtt ttttgccttc tttttagtgg ggttatttgt ttttggatgt tggtgttag 18360  
gggaacatta ttattataac cttaagaaac agatatgtaa tatgttaggat tactgtccc 18420  
tacattaaat tttgcctgag tgctataactt taaaaattt tttgtgttagca tttcagtct 18480  
ttgtttctcc tgaatttgtc attatctctt gtagctgaa ttagcttagca gctctgtgt 18540  
tttattatca gcggaagaaa acaggggctag ctgaaaattt gtgtttgagc aatactttt 18600  
taacataaaa tacaagctt tcttaaaattt gatgaaggag gttcattaaag ccatgttcca 18660  
ggtatatcat ccttagctaa tttctttagg aaaaaaacac tactgctaaag ttagggatgt 18720  
gtttattatg tctgtgctct cactttacca ctagcacccca tcagtcgtg taaagtagaa 18780  
aagttgttcc taaaagaag aaaggatatt ccggagttt tagacaggat tttgttagt 18840  
ctaatacgagg caattctaaa tttagaaacagg catttcataat gtaacaagta aggttgtac 18900  
ttgtttcttt tgactggacc cttggcctca ttcttactct ctactgaatg acctttctt 18960  
aacagaaata taatcattct ccattaaagt cttttgttg gtttctcatc acaagaattc 19020  
catccagact cctcatcgct gccttagttagt ctcacccgtt tcttccctga ccacgtcttc 19080  
ctccgccttc cctgcccattt actatgcttc agctccatttcc acctttttctt gtttttcaga 19140

## S644PCT88.ST25

gataacaggt tccgtccctt ctcaggcttt tacccacttg ctgtttcttt ctttcataga 19200  
 cctttcggtg ggccctttgc actcttagct ctgatgtcag cccctcagga cagccttccc 19260  
 tgaccaacct cttaaagca gctcctcagc cccactctag tcattctctg tcactgcaca 19320  
 ctatttatg tccttcatga gccatgtttg cttatatatt tatttttgtt catccgtctc 19380  
 tagaatttaa tattcttaag ggcattttat tcactgattt gctcccaatt tctactgtgt 19440  
 ttgacacata gtagatgctt aaagaatagt gatttactgg cagtttgct tctaagccta 19500  
 aaaaggatag ttgtcatgaa taaatcatct ttggcatttt ctgtttaata gaaaacaatt 19560  
 gaagatagaa atataaagaa taaaaagtca acaaataata gagcatccag tgcatctgcc 19620  
 aggttaataaa gttaccaata tttgtcattt atgggcttgc attctagcaa agctagttt 19680  
 aatttaactt tcataaaagta aatttcattt ggtgttactg tattttcttt ttatttccat 19740  
 ttcataaaat gaaagtagtt aacttcatga taaaacccct tgggtgatga tattatttga 19800  
 aataaagtaa ttataaaaaa gtaagtctat tactgattgt ttttagtgcct ggaatgttta 19860  
 tgcaataacct ttgctctcca ggatcgtcct aggaatattt ttcttcttc ttaatgtcag 19920  
 tgattaggga ttctttgtgc tccagactgc ttctggaata gagcttctt ctcctacttt 19980  
 tcctgagaca agcaatataa aatggtaata aagctgaagt ctagcaatga tacttattca 20040  
 ttatcaagta tcattgtcta acatgagaaa ttgtactgaa agccttcaga atctatgaac 20100  
 taagtaggtt tattaaaatg attatctgta tagcttcatt cacaccaatg ataatgaatg 20160  
 cctaactcat aagtgctaatt caaaaacctt ctgaatcttt aaaattatcg ttagtcaaatt 20220  
 tattcattaaat caaataaaac agagctagca agcttttct gtaaaatggcc agtttagtgca 20280  
 tatttttaggc ttgttaggacg atacagtctg tattggact actcatttct gctattttaa 20340  
 cagggaaagca gccacaggca aaacttaaca tgaatgatta cagctatggc gcaataaaact 20400  
 ttgtatataa aaaccaatgg ctggccaaat tttccacca atccctgata tagatagtac 20460  
 tattcttctt aattttatat ttggaaatgct tcatgtaaaca aatgtatgaa agaaaatatt 20520  
 aaaagagtga ttataaccctt ctgtattgtt tttccatgt aacttgagaa gtggccata 20580  
 tttcttaagt ttcttaattac aaatattaa aaagagcaat cattttaaag ctatataact 20640  
 taaagttata aaatttaaat tatgttgaag gggacatatt taagttatgt ccccttctac 20700  
 ataatttaat attctttgtt tactaagact gtacattttt cctacatcat tttcaaagta 20760  
 attataattt gttaaatttat aatgttagttt ccaattttt ttttgagatg gagtctcact 20820  
 ctgttgctca ggctggagtt cagtgccatg atctctgctc actgcaacct ctgcctcctg 20880  
 ggctcaagct atccctccac ctcagcctcc aggtagctt tgactacagg catgtgccac 20940  
 cacgccagct aattttttgtt atttttggta gagacagggt ttcaccatgt tgcccaggct 21000  
 ggtcaacagc ccaacaggat gagctcaagt catccaccca ctttggccctt ccaaagtgc 21060  
 gggattacag gtgtgagcca tcatgcctgg ccagtttca aatattatac gtgcattttc 21120  
 taacagatct ctcttctacc aaatgcaattt gtaatattttt gtcttgattc atttggatct 21180

## s644PCT88.ST25

tttcagatta atgacacctg agttttgaa gaaatctgt tctaaaagga gaactccatc 21240  
 gacaactacc tcttctcaact atttagggac tttaaaagtc ttggaccaaa aacccatcaca 21300  
 gaaacagagc atagaacctg atagagcaga taacataagg gcagctgttt atcaggtaaa 21360  
 aaaggaaaat atttttaaga gaagaagaat gatcacttac ataaggctac actgtttata 21420  
 aagaataaaag taatcctgtat agaaaatgtat ggtttaatac ttaaaatttat tgagaaagag 21480  
 tttcctttta atacatgagt aatcatatTT tactaaatta tttgcttcca cacttgcatt 21540  
 aactgaccat agttttttt aaagaaagaa tatgcatttgc caattttagaa aatacagca 21600  
 caagccaaaaa cattgtaaag tctatatacg ttttcatTT tttcttcttgc aagtttata 21660  
 gaacaaaaagg agtttattatg aacaaaaagt tattaaattt tttcttccctt gagatgttgt 21720  
 taggcgtaca taggaaaaag attgtattaa tttattcaca attctaaaag tcttttttgc 21780  
 tcttttttag agtagaatacg tatacttttag aaaattgtac atgtgaattt cagagaaaaat 21840  
 gttaatataa agaattctaa ttcacttaag aaattttaaa tattatatacg cctttttctt 21900  
 gttcttatag gagtggttag aaaagaaaaa tgtgtattta catgaaatgc acagaataaa 21960  
 aagaattgaa agtggaaact taaggatcca aatgaacag gtattctgac atatagaagt 22020  
 aaaaatgttt tggatTTTTt tttcgtaaa atatccctga atatataact tttctaaatc 22080  
 agcttttaa atggcaaaat aacttgcata ttaaagaaat gatttccgggt tttacttgc 22140  
 ttttacttta tacatTTtag tttgatataa ctgtttaca tgaaaacaga ttttaatttt 22200  
 gtatatgtat aggatagctt tgttcctgct gattatgaag ttattattgt ttatgagcac 22260  
 ctaattcact tttaaaagtt gatttcattt agaacttaac caagaaggcc aggtactgtg 22320  
 gctcatgcct gtaatcccag cactttggga ggccaaggca gatgggattt cttgaggct 22380  
 ggagttcgac accagcctgg gcaatgtggt gaaacccat ctctactaaa aataaaaaaa 22440  
 ttagccaggg atggtggtgg gcacctgtaa tcccagctac tcaggaggct gaggtggcag 22500  
 gatcacttga acccgggagg cgagggttgc agttagctga gatcgtgcca ctgtactcca 22560  
 gcctaggtga cagagactct gtctcaaaaa aaaaaaaaaa ggcacgcacaa gataaaggat 22620  
 cattagacac tagttagcct tcaattttcc tctttctctt ctgtatTTt ataagtatct 22680  
 tcaagtccaa cccctacctg aactcttgcattt ctgtatccctt tcccattgaa tggaggtgaa 22740  
 ctTTTGTCC tttcttcttctt gtactgagtc tttccctcta actcctgttt gtaatacgct 22800  
 cagttatttc ttatcttcta aagtcaaaact tctggacaaa aactccagtg tgctgttcaa 22860  
 tactaaaaat agatTTtagaa gaaaaatatt ttccaagggtg aactgcacga taatgcgtca 22920  
 gtagtgaagg gagcagccct ccagggggcg tgccctgtcta tctgttaacc acgttcatag 22980  
 cagttatgtg ctgtggtcag tgccatCACCC cttctcattt gatTTTGTGTA gctctgtgag 23040  
 gtagatagta ctttgacctc taaattatgt taccggaaata ttaaggTTTT atgtcattta 23100  
 atattgaaca ataaagcaaa catagaatat tatgggatta gattgaagga agtaaaataa 23160  
 taacataact tgctatacag tctccaaacctt atttttcagt cgagcacata ctttcaacat 23220

## s644PCT88.ST25

tttggaaataca	tttgtgcagt	aagaacttta	tggtttgata	ctattcaaaa	ttaagattta	23280
aacaaaaat	ctgcatctta	ctgcatggct	tggccaattt	gccttactct	aacttacttt	23340
ataagccat	aactttactg	atttttttt	caaataaaaa	attatgaaaa	ttttactata	23400
ccacttagcc	tattacagtt	tattttgata	taatttgttt	agtacacttt	caaaaataat	23460
agttgacatc	tttctcatta	ataggtcaat	atgtgataaa	tgtttttaga	aaaggacgtt	23520
ttaaaaccaa	tgaataattc	agataacatt	ctttgtaaat	tatctaaagcc	attctaaataa	23580
aattacctac	tttggaaagtt	aatttctaag	tataatgaat	atcagaggac	taaagataaa	23640
tgtatatgt	tatatttata	tctagccata	tttgtgtcta	tgtatataata	catatataatg	23700
tatatcactc	tattttttt	tccactgttag	aaaaaaagctg	ctaaaagaga	agaagcatta	23760
gcatcatttgc	aggcctggaa	ggctatgaaa	gaaaaggaag	caaagaaaat	agctgccaaa	23820
aagaggcttgc	aagaaaaaaa	caagaagaaa	actgaagaag	aaaatgctgc	aagaaaagga	23880
gaagcactac	aagtattcag	aactttgcac	atcttaatta	ttttaaaaca	tttggaaatcc	23940
aaattaatga	ttaaccatat	ttttattttat	tttcaaataat	tcacagtaag	aaaattattc	24000
tgaacttttgc	caggcttttgc	aaaaatggaa	agagaaaaag	atggaatatc	ttaaagagaa	24060
aaatagaaaag	gagagagaat	atgaaagagc	aaagaaacag	aaagaggagg	aaactgttgc	24120
cgagaaaaaaag	aaagataatt	taactgctgt	tgagaaatgg	taatccaaaa	tcataaaataat	24180
tttgatataat	tttaaatttat	agtaacactt	caggatttttgc	taaaattttat	ttacttgaaa	24240
tttagtaatgc	catttcaatt	tcattactgt	caaagatgta	ctaggaaatc	tttattatgt	24300
attttccttgc	aactctccag	tgttttatac	tatgctctat	aggaatgaaa	aaaaggaagc	24360
tttttcaag	caaaaggaaa	aagaaaaat	aaatgagaaa	agaaaggaag	aactgaaaag	24420
agctgagaaa	aaagataaaag	ataaacaagc	tattaatgaa	tatgaaaaat	ggctggtagg	24480
tattatttgc	caatgcactt	tcgttttttgc	catgtacctt	ttgtgtcttt	tctgtcccta	24540
attctaattc	tatttgctcc	agacctactg	atcatttcta	cctggaaatct	gctttgttgc	24600
attcaagctc	tcctcctgca	tatagcatat	tttcttgcac	ttagtcattt	ctattaatgt	24660
ttctactatt	ccctcaaaca	cccaggctga	aaacttgcata	taatcttctt	ccttacctgc	24720
atccccacat	ttaccatttgc	ctattcatgc	ccattttcc	tttgcgttgc	ttctcacatc	24780
taacatagaa	agaagacaag	tttactatttgc	agggtactac	gtgggtggaa	ttgggtcatga	24840
caaaaagtaa	cactgaactt	aatagtgaga	aaattattcc	atcttttatt	ctcttttgat	24900
gtttctgtat	acctcaagga	aatcttta	tttaggaatt	ttaatgaaa	gagagcagg	24960
tttagggtttgc	ggaggagcaa	tagctagctg	aaccagatat	gtgtatataat	ttgatccac	25020
tttacttatac	tttataaaatgc	ttacttttgc	ttgatgtcaa	gcaaaaatatt	attttccatt	25080
tttagaaatatac	aatataaaata	tgcattttgt	ccatgtttat	ataagtaata	cattactatg	25140
aataaaataact	ttacataagt	aggtaacaca	ttcatatgaa	tagttacat	attcatatgaa	25200
ttcagcaacc	aaaattatag	tattttgca	ctagaagtct	atccagtcag	gtttcctatc	25260

## s644PCT88.ST25

aaactttaaa acaactcata ccaatcaact aaatcatcca ggttgtttt gatttgcatt 25320  
 tctctggta gaattgagct tgaatatctt ttcatttgc tacaggccat ttatcttata 25380  
 ttttctctgt aaattgtcat ttcatagact ttgcacactt ttctattaga ttgttggtt 25440  
 ttttcctta ctggtttcta gaatctttg ttttgtactg gggaaattag cctatcattt 25500  
 tttatatggg ttgcaaataat ttaccccccac tatattgttg gtttcccggc tttccttata 25560  
 gtatctcatg ccatgaagaa tttaaatttt aggtgtcaga tttctgtttt tttttttgg 25620  
 ctttgattt tcaagcatag ttgaaaagac ctacacaatt ttagattaaa cagaattatc 25680  
 ttatTTTct tctaacaact ttgtgacttt aatatcttaa tgTTTtaaca tttgttctgc 25740  
 ttggaatttg ccctgataca tggggaaa tatgattca actttagttt ttccaaatgt 25800  
 atcctttata aagtagccca ttTTTaccca ttgatttgag gtgctacttc tgTTTatga 25860  
 taccttctca tgTTTcggg tctgtttctt aactttctgt tccattggtc agtctcgtga 25920  
 ttccagtgcc acacttccat tattaggctt gatatgtcta aatatctgct tggattcatc 25980  
 tccctttata gttttttttt cacagtcttt ctgaccagtc ttgTTTattt atTTTTccca 26040  
 taaacttaag aatcagcagt agtttagaaag gtacatggga cccaaatgag cgatttaaag 26100  
 ataggataaa aagataaaac aataataaac ttaagaaaca tgccagacca acataaagaa 26160  
 aattgttagaa ctctcctgaa caacacaaat gaagacttga gaaaatggat cagaattgcc 26220  
 catgcacaga aacacactta accttataat gatgttataa ggatgtcagc tctccctgaa 26280  
 gtcatttaat gcaatcttaa caaaagccaa caggatttac tctgtgtgtt gagTTTtagta 26340  
 ctgctatatg ctaattcgat gcagagaaat agtaataaaa taaggtatc aaaattggtt 26400  
 caattttgaa tgaaaaaggt agtgtttcat gatgattcc ttaagttaat ctgttaata 26460  
 atgctatgtt ctaaaaaaaaa atttaaagtc cacttatatt aagaagatgt acactgactg 26520  
 ctagtatcaa ttagggaaat taaatgtaaa cattttagtt ttccattttt attccatatc 26580  
 ttcatgaaaa tggaatagaa ttcttttaat aagtcacatt taggtatact gtttttaatt 26640  
 atagcactta attacattgt catttttatac agtccctctga agaacaagaa ttccctcaaag 26700  
 accaaagaca aaataacatg ttgatatct agtaaaatgt ctgcaaataat agtacaccta 26760  
 taaacacata aacatacatg ttacagatcg gttctcccttc ttaccaaatt cttattgaaa 26820  
 ttgtttgca gatagaatag aaaaattgcc cctgtatagg agtctaatga cttcagttt 26880  
 catggaaaac aacatctcaa gcttttata tacaaactag tttgaacagt aagcatttgg 26940  
 tgggttaattt gtttagggaa aagttatag ccaaagatca ggtaagacta aaatattttt 27000  
 cttgccaattt accagattaa ttcatcatta cctttagtaa gaaaataagc aaaaagctca 27060  
 gttttccaca aataaatgtc tgaaggactt tttaacaagg ttcttttaat tactatcaag 27120  
 gtgactattg attctttga actgatatta cagttatata aattgtctat ttgctaccct 27180  
 ggctttacag ctccctgcta gtaagatgaa gcatattca agttactgcc ccctcatgtt 27240  
 aagtgaaattt acaaaaagag atttattcag tcaatttctg tggacacagt ctggtcactg 27300

## s644PCT88.ST25

cttttcttcc gccttagctag atggctgtc tctaaaatataaaaatgatt gaagatgatc 27360  
 taattacagc tttgctttc tcaattaaaa ttctgaaagg aagtttcctc tttgccttat 27420  
 tagaaatagc aagcaaacaa acatgcaagc attcttatga catggaatga ggatatgggt 27480  
 gttaacattg acaaaaaaca aacaaacctc ccacttcaact ttgtttgtt catgtgaatg 27540  
 gaaagcttgt cctgtattgc catattattc ttgtggcatt tatatatata ctgatgaaaa 27600  
 gatgcataca tacctaatac tttccataa tgcccttcct cccaagccat caacctgcag 27660  
 aggccaggttt cactaagggt tttcctgctc cttgaggaat atgagaaaaa taccaagatg 27720  
 aagaaaccac caaaccttat agtggtagca gagacataaa gggacacctg gtgccttcct 27780  
 tccatttctt gtctcctgcc ttctgccaag ccttagtcac aatggatatt ttgtttcct 27840  
 cccacagcac acatttttt tcccactctc agagccctca ccactactgt ttgcaagcaa 27900  
 agctcttccc cgatatttat cacgagtggc ttctcttatac catcatgtca cacttcaaag 27960  
 ggactttccc tgagtccatt ttttggaa agtaaatact ctttttatt ctttctcata 28020  
 gttttaaaac atgtttcaga gaaattcaca caatttggaa ttatctgtt 28080  
 ttgtttctgt ccattttgaa agtccctgg gggacaggga ccatactgt gtgttggat 28140  
 tttaaaaat tattttatt tgcaaatgac acataaaaag tgcacatatt tatggaatac 28200  
 agtgtgatgt ttccatctac attgtataca ttgtgtaca atcagaaatg actcacaaag 28260  
 gtaggcaaaa tggttgc 28320  
 tactaaaaat taaaggcaaa taccatacat ttaaatgggc caaataattg agcagaaaaat 28380  
 ttacaaaagg ctaaagaaaat gttgaaaat gtgctcaagt tcaataataa agaaacatga 28440  
 ggcagaattt ttaactattt gtaaaaaatt tgaagtatct catactgtca tgacatattg 28500  
 aaactttgca cccagtaaac ttacttctga gaatttggc tcacgaagtc accaccaact 28560  
 tataacagtt actatattt 28620  
 agttataatt ataggcttt ttttctattt tatacaattc 28680  
 ttttttaatg ttttcaattt taaagttaa aaaattaatg gatatttagta cttgcaaatt 28740  
 gacaatgttt actaattttt ttcttggcatttttgt ttgtttgtt ttttggaca 28800  
 gggctctact ctgttgc 28860  
 ccaccccttca ggctcaagca atccctccat ctcagccctc taagtaggtg ggactatagg 28920  
 catgcaccgc cacacctggc taattttgtt gttgtttgtt agagatgtatgtt 28980  
 ttcccaggc tggtctcgaa ctcccaggct caaacaatcc acccacctt 29040  
 gttctggat tactggcatg agccaccatg cctggcccta cctgttattt ctttatgatc 29100  
 tgttaaacta ggaagtgata tataaataatc ctataatgg 29160  
 caacctgatt tgaaaataat aatcatatataatgtatgtt ctatccatc 29220  
 ttcttggaaag tgaggcactt cctccgtgaa gcccctcaag cagaactgtg ttgc 29280  
 tgttttgata attcttagttt ttacattttt tggttattt tcgggtttgcc aatattagcc 29340

## s644PCT88.ST25

atagatttaa aaccattcaa ttatTTatag ttagaggaat atatTTtaat taaatGCCAG 29400  
 acactCCtgc tgacaatgaa agaaatactt tggaaatgtaa tcagtGAAAG cattTTTTG 29460  
 aactgtAGAT aaactGCCTC aaacAAAGAC ctaataatca gattGTTTT accattaAGA 29520  
 tacataAGAT tttatcatgt cctgataatt cttatGGTGG agtGATTcat gatCTTTTC 29580  
 attaAGCTCT gtatGTTATT taagtatATT taattCCAGT aataAAAAGG aaATCATCTA 29640  
 ggtaccataa tgatAGAAAT tattCCTTT gtggatGATT gtGAATCTAG attcAGGTTT 29700  
 ttAAATGAAG ggtcgctGGG aagtGCGcat atattattCC ttctgAAACT 29750

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 200

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 17  
 acttcCTTCG tctgggtggT tgccccAGCG acacGTTGGG ccGAAGAGCG gtGTTGGGta 60  
 cccGAGAGAC cggcGGTGG ggaAGTCACT tcctCCCGAA gacGCTGTT cctAGCAACC 120  
 gCCCTCCGcc tctgttatta gCCCTCCTC ctcGCTCGGT ccAGGACCGG ctctGCGGGC 180  
 gCGCCAGGC ccAGACCAAG 200

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 18  
 ctactatCAG aagtGAATT ctaataATTa gCTATTTAT aaAGGtaACG agaaaaAAATA 60  
 cactatGTCT gatGAAGTTT ttagcaccAC tttGGCATAT accAAAGAGTC caAAAGTTAC 120  
 caAAAGAAACT actttCCAG 139

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 85

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 19  
 gatGAGCTAA taAGAGCAAT tacAGCTCGC tcAGCCAGAC aaAGGAGTTC tGAATACTCA 60  
 gatGACTTG acAGTGTGA gATTG 85

## S644PCT88.ST25

<210> 20  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 20  
tttcctttagg tgattttctt gacacttcag cagataaaaa ttcagttaat aaaaaaatga 60  
atgactttca tatatcagat gatgaagaaa agaatccttc aaaactattg ttttgaaaaa 120  
ccaataaaatc aaacggtaac ataaccaaag atgagccagt gtgtgccatc aaaaatgaag 180  
aggaaatggc acctgatggg tgtgaagaca ttgttgtaaa atctttctct gaatctcaaa 240  
ataaggatga ggaatttcaa aaagacaaaaa taaaaatgaa acctaaaccc agaattcttt 300  
caattaaaaag cacatcttca g 321

<210> 21  
<211> 227  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 21  
cagaaaaacaa cagccttgac acagatgatc actttaaacc atcacctcgg ccaaggagta 60  
tgttggaaaaa gaaaagtcac atggaggaga aggatggact agaagataaa gaaactgccc 120  
tcagtgaaaga attggaggta cattctgcac cttctccct tccaacgccc aatggcatac 180  
aattagaagc tgagaaaaaa gcattctctg aaaaccttga tcctgag 227

<210> 22  
<211> 94  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 22  
gattcatgct taacaagtct agcatcatca tcacttaaac aaattctgg agattcttt 60  
tcaccaggat ctgagggaaa cgcatctgga aaag 94

<210> 23  
<211> 248  
<212> DNA

s644PCT88.ST25

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 23		
atccaaatga agaaatcaact gaaaaccata attccttcaa atcagatgaa aataaagaga	60	
attcattttc agcagaccat gtgactactg cagttgagaa atccaaggaa agtcaagtga	120	
ctgctgatga ccttgaagaa gaaaaggcaa aagcggact gattatggat gatgacagaa	180	
cagttgatcc actactatct aaatctcaga gtatcttaat atctaccagt gcaacagcat	240	
cttcaaag	248	

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 71

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 24		
aaaacaattg aagatagaaa tataaagaat aaaaagtcaa caaataatag agcatccagt	60	
gcatctgccaa g	71	

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 169

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 25		
attaatgacc tctgagtttt tgaagaaatc tagttctaaa aggagaactc catcgacaac	60	
tacctcttct cactatttag ggactttaaa agtcttggac caaaaacctt cacagaaaca	120	
gagcatagaa cctgatagag cagataacat aagggcagct gtttatcag	169	

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 90

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 26		
gagtggtag aaaagaaaaa tgtgtattta catgaaatgc acagaataaa aagaattgaa	60	
agtgaaaact taaggatcca aaatgaacag	90	

&lt;210&gt; 27

s644PCT88.ST25

&lt;211&gt; 160

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 27  
aaaaaaagctg ctaaaagaga agaagcatta gcatcattt aggccctggaa ggctatgaaa 60  
gaaaaggaag caaagaaaat agctgccaaa aagaggctt aagaaaaaaa caagaagaaa 120  
actgaagaag aaaatgctgc aagaaaagga gaagcactac 160

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 146

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 28  
gcttttggaaa aatggaaaga gaaaaagatg gaatatctta aagagaaaaa tagaaaggag 60  
agagaatatg aaagagcaaa gaaacagaaa gaggagggaaa ctgttgccga gaaaaagaaa 120  
gataatttaa ctgctgttga gaaatg 146

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 133

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 29  
gaatgaaaaa aaggaagctt ttttcaagca aaagggaaaaa gaaaaaataa atgagaaaaag 60  
aaaggaagaa ctgaaaagag ctgagaaaaa agataaagat aaacaagcta ttaatgaata 120  
tgaaaaatgg ctg 133

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 485

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 30  
gaaaataagg aaaaacaaga aagaattgaa cgaaaacaga agaaacgtca ttcctttctt 60  
gaaagtgagg cacttcctcc gtggagccct ccaagcagaa ctgtgttgcgcaaaatgttt 120  
tgataattct agttcttaca ttatgggtt atttatcggt ttgccaatat tagccataga 180

## s644PCT88.ST25

tttaaaaacca ttcaattatt tatagttaga ggaatataatt ttaattaaat gccagacact	240
cctgctgaca atgaaagaaa tactttggaa tgtaatcagt gaaagcattt ttttgaactg	300
tagataaaact gcctcaaaca aagacctaatt aatcagattt tttttaccat taagatacat	360
aagattttat catgtcctga taattcttatt ggtggagtga ttcatgatct ttttcattaa	420
gctctgtatg ttatthaagt atatthaattt ccagtaataa aaaggaaatc atctaggtac	480
cataa	485

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 31 atgtctgatg aagtttttag cacc	24
--	----

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 32 aggcctcaaa tgatgctaat gc	22
--------------------------------------	----

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 33 atcatttgag gcctggaagg c	21
-------------------------------------	----

s644PCT88.ST25

<210> 34  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce

<400> 34  
aaacactttt gcgaacacag ttc 23

<210> 35  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce  
<400> 35  
acaacgaata acagagtgtc c 21

<210> 36  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce  
<400> 36  
actcctgata aacagctgcc 20

<210> 37  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce

s644PCT88.ST25

<400> 37  
gccaccatgt ctgatgaagt ttttagcac 29

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 38  
gaaacacttt tgcgaacaca gttc 24

<210> 39

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 39  
taatgtctga tgaagttttt agcacc 26

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 40  
tcaaaacact tttgcgaaca cagttc 26

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

s644PCT88.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 41

aatgtctgat gaagtttta gcacc

25

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 42

tcagcttgcc gtaggtggc

19

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 43

atggtcctgc tggagttcg

19

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 391

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Murinae gen. sp.

&lt;400&gt; 44

aaagaagtga agacagaaaac acgaagaata aaaagacaac gaataacaga gtgtccagtg

60

cctctggcag gctgatgacc tctgagttt taaagagatc cggccccaca aaaagaagtc

120

catctgcagc tacctcctca cactat tag ggagttgaa agtcttggac cagaagcaac

180

cacgaaagca gagccttagag ccagacaagg ctgatcacat aagggcagct gtttatcagg

240

agtggtaga aaagaaaaat gtgtattac atgaaatgca cagaataaaa agaattgaaa

300

gcgaaaactt gaggatccaa aatgaacaga aaaaagctgc taagagagag gaagccctgg

360

catcattga ggcctggaag gcaatgaaag a

391

s644PCT88.ST25

<210> 45  
<211> 2767  
<212> DNA  
<213> *Mus musculus*

<220>  
<221> CDS  
<222> (204)..(2147)  
<223>

<400> 45  
gttgggtacc caagagacca ggcgggttgg a g t c a c t t c c t c c c g g g g g a c c g t g t t g c c t  
agcaaccgccc ttctgcctcc atctttgcc c c g c c t c c a g g t t a t t c c a a t a c t g g t t t t c  
cccagaccgc gaggccccggg c c g g g g g c g a c a c t g t g c t a g a g c a t a g c c g c t g g g t t c  
t c a g c a g a g a a a a g g a c a c a c c a t g t c c g a t g a a t c t t c a c t t g t t g  
Met Ser Asp Glu Ile Phe Ser Thr Thr Leu  
1 5 10  
g c g t a c a c c a a g a g t c c a a a g g c t a c c a a g a g a a c t t c c t t t c a g g a t  
Ala Tyr Thr Lys Ser Pro Lys Ala Thr Lys Arg Thr Ser Phe Gln Asp  
15 20 25  
g a g c t g a t c a g a g c c a t t a c a g c c g g t c a g c c a g g c a g a g a t t c c  
Glu Leu Ile Arg Ala Ile Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser  
30 35 40  
g a a t a c t c c g a t g a c t t t g a c a g t g a c g a g a t t g t t c t t t a g g t g a a  
Glu Tyr Ser Asp Asp Phe Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Glu  
45 50 55  
t t t t c a g a t t c g a c a g a t g a a a g t c t a g t t a g a a a a g a t g a t  
Phe Ser Asp Thr Ser Asp Asp Glu Ser Leu Val Arg Lys Lys Met Asn  
60 65 70  
g a t t t c a t a t c c g a c g a t g a g g a a a a a t t c t c c a a g a c t g t c t  
Asp Phe His Ile Ser Asp Asp Glu Glu Lys Asn Ser Pro Arg Leu Ser  
75 80 85 90  
t t t t t g a a a c c a a g a a a g t a a a c g g c a a t a t c c a a c g a t g c t c t g  
Phe Leu Lys Thr Lys Val Asn Arg Ala Ile Ser Asn Asp Ala Leu  
95 100 105  
g a c t c c a g c a c t c c g g g a c g a g a g g g c t c a c c g g a t g c t c a a g a a  
Asp Ser Ser Thr Pro Gly Ser Glu Gly Ser Ser Pro Asp Ala Gln Glu  
110 115 120  
g a t g t g a c t g g a g a t t c c c t c c c a a a t c t c a a a t g a t g a t c g a g a  
Asp Val Thr Gly Asp Ser Leu Pro Lys Ser Gln Asn Asp Asp Arg Glu  
125 130 135  
g t c g g c a g a g a t c a t c a c a g t g a a g c c t a c a c c c a g g a t g c a c c c  
Val Gly Arg Glu Ile Ile Thr Val Lys Pro Thr Pro Arg Met His Pro  
140 145 150

## s644PCT88.ST25

gtc	aaa	aga	agc	acg	tcc	tcg	ggg	gaa	acc	agc	agc	ggt	ctt	gat	gca	713
Val	Lys	Arg	Ser	Thr	Ser	Ser	Gly	Glu	Thr	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Ala	
155					160				165					170		
gat	ggc	cac	ttt	aag	cct	tca	ccc	cag	cca	agg	agc	atg	tta	aaa	aag	761
Asp	Gly	His	Phe	Lys	Pro	Ser	Pro	Gln	Pro	Arg	Ser	Met	Leu	Lys	Lys	
				175				180					185			
agc	agc	cac	act	gag	gag	gga	gtc	aga	cca	gga	gtt	gat	aaa	gaa	cat	809
Ser	Ser	His	Thr	Glu	Glu	Gly	Val	Arg	Pro	Gly	Val	Asp	Lys	Glu	His	
				190			195						200			
tcc	ata	agc	gaa	gcc	tct	gct	ccc	aca	cct	tcc	ctt	cca	agg	cag	aat	857
Ser	Ile	Ser	Glu	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Arg	Gln	Asn	
	205				210						215					
ggc	aca	gag	ttg	caa	act	gag	gaa	aaa	ata	ta	tcg	gaa	aac	ctc	gat	905
Gly	Thr	Glu	Leu	Gln	Thr	Glu	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ser	Glu	Asn	Leu	Asp	
	220			225						230						
ctt	gag	gac	tca	ctc	tta	caa	agt	ctg	acc	tca	tct	tcc	ttc	aaa	gaa	953
Leu	Glu	Asp	Ser	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	Ser	Phe	Lys	Glu	
	235			240				245						250		
agc	ccc	gga	ggt	tgc	aca	tca	cca	gga	tct	cag	gaa	aag	gtg	ccc	ata	1001
Ser	Pro	Gly	Gly	Cys	Thr	Ser	Pro	Gly	Ser	Gln	Glu	Lys	Val	Pro	Ile	
				255			260						265			
aaa	gat	cat	gat	gga	gaa	cct	act	gaa	atc	tgg	gat	tcc	ttg	cta	tca	1049
Lys	Asp	His	Asp	Gly	Glu	Pro	Thr	Glu	Ile	Trp	Asp	Ser	Leu	Leu	Ser	
	270			275						280						
aat	gaa	aat	gaa	gga	agt	tct	gtt	ttg	gtg	aac	tgt	gtt	act	cct	gaa	1097
Asn	Glu	Asn	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Cys	Val	Thr	Pro	Glu	
	285			290				295								
ctc	gag	cag	ccc	aag	gac	ggt	cag	gtg	gca	gct	gac	gac	ctt	gag	gaa	1145
Leu	Glu	Gln	Pro	Lys	Asp	Gly	Gln	Val	Ala	Ala	Asp	Asp	Leu	Glu	Glu	
	300			305				310								
gaa	aga	gag	aag	ggt	gga	ttt	aca	gaa	gat	gac	ctc	acc	act	gac	ccg	1193
Glu	Arg	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe	Thr	Glu	Asp	Asp	Leu	Thr	Thr	Asp	Pro	
	315			320				325						330		
ctg	ctc	tcc	acg	tcc	ccg	agt	gtc	ata	aca	ccc	act	gag	cca	gca	gag	1241
Leu	Leu	Ser	Thr	Ser	Pro	Ser	Val	Ile	Thr	Pro	Thr	Glu	Pro	Ala	Glu	
				335			340						345			
ccg	gcc	aag	aaa	gca	aat	gaa	gac	aga	aac	acg	aag	aat	aaa	aag	aca	1289
Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Asn	Glu	Asp	Arg	Asn	Thr	Lys	Asn	Lys	Lys	Thr	
				350			355						360			
acg	aat	aac	aga	gtg	tcc	agt	gcc	tct	ggc	agc	agg	ctg	atg	acc	tct	1337
Thr	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Arg	Leu	Met	Thr	Ser	
	365			370				375								
gag	ttt	tta	aag	aga	tcc	ggt	ccc	aca	aaa	aga	agt	cca	tct	gca	gct	1385
Glu	Phe	Leu	Lys	Arg	Ser	Gly	Pro	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Ser	Ala	Ala	
	380			385				390								
acc	tcc	tca	cac	tat	tta	ggg	agt	ttg	aaa	gtc	ttg	gac	cag	aag	caa	1433
Thr	Ser	Ser	His	Tyr	Leu	Gly	Ser	Leu	Lys	Val	Leu	Asp	Gln	Lys	Gln	
				395				400			405			410		
cca	cg	aag	cag	agc	cta	gag	cca	gac	aag	gct	gat	cac	ata	agg	gca	1481
Pro	Arg	Lys	Gln	Ser	Leu	Glu	Pro	Asp	Lys	Ala	Asp	His	Ile	Arg	Ala	
				415				420					425			

## s644PCT88.ST25

gct gtt tat cag gag tgg tta gaa aag aaa aat gtg tat tta cat gaa	1529
Ala Val Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu	
430 435 440	
atg cac aga ata aaa aga att gaa agc gaa aac ttg agg atc caa aat	1577
Met His Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn	
445 450 455	
gaa cag aaa aaa gct gct aag aga gag gaa gcc ctg gca tca ttt gag	1625
Glu Gln Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu	
460 465 470	
gcc tgg aag gca atg aaa gag aag gaa gca aag aga ata gct gca aaa	1673
Ala Trp Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Arg Ile Ala Ala Lys	
475 480 485 490	
aag agg ctg gag gaa aag aac aag aag aaa aca gaa gaa gaa aat gcc	1721
Lys Arg Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala	
495 500 505	
atg agg aaa ggc gag gcc ctg caa gca ttt gaa aaa tgg aaa gag aaa	1769
Met Arg Lys Gly Glu Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys	
510 515 520	
aag cta gaa tac ctc aaa gag aag acc agg agg gag aaa gaa tat gaa	1817
Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Glu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Glu Tyr Glu	
525 530 535	
aga gca aag aaa cag aaa gaa gag gaa gca gtt gct gag aaa aag aaa	1865
Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu Glu Ala Val Ala Glu Lys Lys Lys	
540 545 550	
gac agt tta act gct ttt gaa aaa tgg agt gag aga aag gaa gct ctc	1913
Asp Ser Leu Thr Ala Phe Glu Lys Trp Ser Glu Arg Lys Glu Ala Leu	
555 560 565 570	
ctc aag caa aag gag aag gag aaa ata aat gag aga aga aag gaa gag	1961
Leu Lys Gln Lys Glu Lys Glu Lys Ile Asn Glu Arg Arg Lys Glu Glu	
575 580 585	
ctg aag aga gcc gag aag aaa gac aaa gac aag caa gcc atc agt gaa	2009
Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Ser Glu	
590 595 600	
tac gaa aag tgg ctg gaa aag aaa gaa agg caa gaa aga att gaa cgg	2057
Tyr Glu Lys Trp Leu Glu Lys Lys Glu Arg Gln Glu Arg Ile Glu Arg	
605 610 615	
aaa cag aag aag cgc cac tcc ttc ctt gag agc gag aca cac cca cca	2105
Lys Gln Lys Lys Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Thr His Pro Pro	
620 625 630	
tgg agt cct ccg agc aga act gcg ccc tca aaa gta ttt tga	2147
Trp Ser Pro Pro Ser Arg Thr Ala Pro Ser Lys Val Phe	
635 640 645	
tgtttctggc tcttgatttt tttttcagtt caccaactgt actcatggat ttaaaaacgag	2207
tcatctcatt atttgtggtt agaagactct atgtcacttc cctgcaggag cttctgtgga	2267
gcatgaaaga gatactttgc agttaatca gtggaaacat tttctgaagt gtcctcatca	2327
gtttgctggc acaatccaga cgcataaagc tttattatga cctgaacagt ctgggtgtggc	2387
gtgattcgtg gtcactgtcg ctgagttcgg agtctttta aagaatgttt gatcccacta	2447
atgaaagaat gccagctaga taccacaatc gtagagatga ctcggctgt ggaagtctgt	2507

s644PCT88.ST25

gcttcttagag	tgttagtttgg	gcattgaagg	tccctggaga	ccatgggcat	gttatctctt	2567
ctaactccag	ttcttcaggt	cacagaagta	tcttgctgt	gcaagttatc	gactcagtca	2627
gttgaggcca	cagaactcta	gtcagtcact	ttagtaaaga	actttgccat	agggttaat	2687
ctcggtgtgg	tttgccctct	tgaggcttac	ctgacaatcg	tagccacctc	tataatgggc	2747
tcacttctgg	aatgttcttt					2767

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 647

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 46

Met	Ser	Asp	Glu	Ile	Phe	Ser	Thr	Thr	Leu	Ala	Tyr	Thr	Lys	Ser	Pro
1				5					10				15		

Lys	Ala	Thr	Lys	Arg	Thr	Ser	Phe	Gln	Asp	Glu	Leu	Ile	Arg	Ala	Ile
			20			25						30			

Thr	Ala	Arg	Ser	Ala	Arg	Gln	Arg	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser	Asp	Asp	Phe
35					40					45					

Asp	Ser	Asp	Glu	Ile	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Phe	Ser	Asp	Thr	Ser	Thr
50					55					60					

Asp	Glu	Ser	Leu	Val	Arg	Lys	Lys	Met	Asn	Asp	Phe	His	Ile	Ser	Asp
65					70			75			80				

Asp	Glu	Glu	Lys	Asn	Ser	Pro	Arg	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys	Thr	Lys	Lys
85						90						95			

Val	Asn	Arg	Ala	Ile	Ser	Asn	Asp	Ala	Leu	Asp	Ser	Ser	Thr	Pro	Gly
100						105					110				

Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Pro	Asp	Ala	Gln	Glu	Asp	Val	Thr	Gly	Asp	Ser
115					120					125					

Leu	Pro	Lys	Ser	Gln	Asn	Asp	Asp	Arg	Glu	Val	Gly	Arg	Glu	Ile	Ile
130					135					140					

Thr	Val	Lys	Pro	Thr	Pro	Arg	Met	His	Pro	Val	Lys	Arg	Ser	Thr	Ser
145					150			155		160					

Ser	Gly	Glu	Thr	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Ala	Asp	Gly	His	Phe	Lys	Pro
165						170					175				

s644PCT88.ST25

Ser Pro Gln Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser Ser His Thr Glu Glu  
 180 185 190

Gly Val Arg Pro Gly Val Asp Lys Glu His Ser Ile Ser Glu Ala Ser  
 195 200 205

Ala Pro Thr Pro Ser Leu Pro Arg Gln Asn Gly Thr Glu Leu Gln Thr  
 210 215 220

Glu Glu Lys Ile Tyr Ser Glu Asn Leu Asp Leu Glu Asp Ser Leu Leu  
 225 230 235 240

Gln Ser Leu Thr Ser Ser Ser Phe Lys Glu Ser Pro Gly Gly Cys Thr  
 245 250 255

Ser Pro Gly Ser Gln Glu Lys Val Pro Ile Lys Asp His Asp Gly Glu  
 260 265 270

Pro Thr Glu Ile Trp Asp Ser Leu Leu Ser Asn Glu Asn Glu Gly Ser  
 275 280 285

Ser Val Leu Val Asn Cys Val Thr Pro Glu Leu Glu Gln Pro Lys Asp  
 290 295 300

Gly Gln Val Ala Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Arg Glu Lys Gly Gly  
 305 310 315 320

Phe Thr Glu Asp Asp Leu Thr Thr Asp Pro Leu Leu Ser Thr Ser Pro  
 325 330 335

Ser Val Ile Thr Pro Thr Glu Pro Ala Glu Pro Ala Lys Lys Ala Asn  
 340 345 350

Glu Asp Arg Asn Thr Lys Asn Lys Lys Thr Thr Asn Asn Arg Val Ser  
 355 360 365

Ser Ala Ser Gly Ser Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Arg Ser  
 370 375 380

Gly Pro Thr Lys Arg Ser Pro Ser Ala Ala Thr Ser Ser His Tyr Leu  
 385 390 395 400

Gly Ser Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Gln Pro Arg Lys Gln Ser Leu  
 405 410 415

Glu Pro Asp Lys Ala Asp His Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp  
 420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg  
 435 440 445

s644PCT88.ST25  
Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala  
450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys  
465 470 475 480

Glu Lys Glu Ala Lys Arg Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys  
485 490 495

Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Asn Ala Met Arg Lys Gly Glu Ala  
500 505 510

Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Leu Glu Tyr Leu Lys  
515 520 525

Glu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys  
530 535 540

Glu Glu Glu Ala Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Ser Leu Thr Ala Phe  
545 550 555 560

Glu Lys Trp Ser Glu Arg Lys Glu Ala Leu Leu Lys Gln Lys Glu Lys  
565 570 575

Glu Lys Ile Asn Glu Arg Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys  
580 585 590

Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu  
595 600 605

Lys Lys Glu Arg Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His  
610 615 620

Ser Phe Leu Glu Ser Glu Thr His Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg  
625 630 635 640

Thr Ala Pro Ser Lys Val Phe  
645

<210> 47

<211> 647

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 47

Met Ser Asp Glu Ile Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
1 5 10 15

s644PCT88.ST25

Lys Ala Thr Lys Arg Thr Ser Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Glu Phe Ser Asp Thr Ser Thr  
50 55 60

Asp Glu Ser Leu Val Arg Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Ser Pro Arg Leu Ser Phe Leu Lys Thr Lys Lys  
85 90 95

Val Asn Arg Ala Ile Ser Asn Asp Ala Leu Asp Ser Ser Thr Pro Gly  
100 105 110

Ser Glu Gly Ser Ser Pro Asp Ala Gln Glu Asp Val Thr Gly Asp Ser  
115 120 125

Leu Pro Lys Ser Gln Asn Asp Asp Arg Glu Val Gly Arg Glu Ile Ile  
130 135 140

Thr Val Lys Pro Thr Pro Arg Met His Pro Val Lys Arg Ser Thr Ser  
145 150 155 160

Ser Gly Glu Thr Ser Ser Gly Leu Asp Ala Asp Gly His Phe Lys Pro  
165 170 175

Ser Pro Gln Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser Ser His Thr Glu Glu  
180 185 190

Gly Val Arg Pro Gly Val Asp Lys Glu His Ser Ile Ser Glu Ala Ser  
195 200 205

Ala Pro Thr Pro Ser Leu Pro Arg Gln Asn Gly Thr Glu Leu Gln Thr  
210 215 220

Glu Glu Lys Ile Tyr Ser Glu Asn Leu Asp Leu Glu Asp Ser Leu Leu  
225 230 235 240

Gln Ser Leu Thr Ser Ser Ser Phe Lys Glu Ser Pro Gly Gly Cys Thr  
245 250 255

Ser Pro Gly Ser Gln Glu Lys Val Pro Ile Lys Asp His Asp Gly Glu  
260 265 270

Pro Thr Glu Ile Trp Asp Ser Leu Leu Ser Asn Glu Asn Glu Gly Ser  
275 280 285

s644PCT88.ST25

Ser Val Leu Val Asn Cys Val Thr Pro Glu Leu Glu Gln Pro Lys Asp  
 290 295 300

Gly Gln Val Ala Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Arg Glu Lys Gly Gly  
 305 310 315 320

Phe Thr Glu Asp Asp Leu Thr Thr Asp Pro Leu Leu Ser Thr Ser Pro  
 325 330 335

Ser Val Ile Thr Pro Thr Glu Pro Ala Glu Pro Ala Lys Lys Ala Asn  
 340 345 350

Glu Asp Arg Asn Thr Lys Asn Lys Lys Thr Thr Asn Asn Arg Val Ser  
 355 360 365

Ser Ala Ser Gly Ser Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Arg Ser  
 370 375 380

Gly Pro Thr Lys Arg Ser Pro Ser Ala Ala Thr Ser Ser His Tyr Leu  
 385 390 395 400

Gly Ser Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Gln Pro Arg Lys Gln Ser Leu  
 405 410 415

Glu Pro Asp Lys Ala Asp His Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp  
 420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg  
 435 440 445

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala  
 450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys  
 465 470 475 480

Glu Lys Glu Ala Lys Arg Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys  
 485 490 495

Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Asn Ala Met Arg Lys Gly Glu Ala  
 500 505 510

Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Leu Glu Tyr Leu Lys  
 515 520 525

Glu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys  
 530 535 540

Glu Glu Glu Ala Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Ser Leu Thr Ala Phe  
 545 550 555 560

Glu Lys Trp Ser Glu Arg Lys Glu Ala Leu Leu Lys Gln Lys Glu Lys  
565 570 575

Glu Lys Ile Asn Glu Arg Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys  
580 585 590

Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu  
595 600 605

Lys Lys Glu Arg Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His  
610 615 620

Ser Phe Leu Glu Ser Glu Thr His Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg  
625 630 635 640

Thr Ala Pro Ser Lys Val Phe  
645

<210> 48

<211> 344

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> hASAP peptide mutant 411-647

<400> 48

Glu Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Ala  
1 5 10 15

Glu Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys  
20 25 30

Ser Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys  
35 40 45

Thr Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg  
50 55 60

Ala Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys  
65 70 75 80

Ser Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr  
85 90 95

Leu Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser  
100 105 110

s644PCT88.ST25

Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu  
 115 120 125

Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys  
 130 135 140

Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala  
 145 150 155 160

Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met  
 165 170 175

Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu  
 180 185 190

Lys Asn Lys Lys Thr Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys Gly Glu  
 195 200 205

Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu  
 210 215 220

Lys Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln  
 225 230 235 240

Lys Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala  
 245 250 255

Val Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys  
 260 265 270

Lys Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu  
 275 280 285

Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp Leu  
 290 295 300

Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg  
 305 310 315 320

His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser  
 325 330 335

Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
 340

<210> 49

<211> 237

<212> PRT

<213> artificial sequence

s644PCT88.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hASAP mutant 411-647

&lt;400&gt; 49

Ser Gln Lys Gln Ser Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala  
1 5 10 15Ala Val Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu  
20 25 30Met His Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn  
35 40 45Glu Gln Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu  
50 55 60Ala Trp Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys  
65 70 75 80Lys Arg Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala  
85 90 95Ala Arg Lys Gly Glu Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys  
100 105 110Lys Met Glu Tyr Leu Lys Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu  
115 120 125Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys  
130 135 140Asp Asn Leu Thr Ala Val Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe  
145 150 155 160Phe Lys Gln Lys Lys Lys Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu  
165 170 175Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu  
180 185 190Tyr Glu Lys Trp Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg  
195 200 205Lys Gln Lys Lys Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro  
210 215 220Trp Ser Pro Pro Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
225 230 235

s644PCT88.ST25

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 170

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hASAP mutant 478-647

&lt;400&gt; 50

Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu  
1 5 10 15Glu Glu Lys Asn Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys  
20 25 30Gly Glu Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu  
35 40 45Tyr Leu Lys Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys  
50 55 60Lys Gln Lys Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu  
65 70 75 80Thr Ala Val Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln  
85 90 95Lys Lys Lys Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg  
100 105 110Ala Glu Lys Lys Asp Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys  
115 120 125Trp Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys  
130 135 140Lys Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro  
145 150 155 160Pro Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
165 170

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 477

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

s644PCT88.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hASAP mutant 1-477

&lt;400&gt; 51

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala  
50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys  
85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn  
100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser  
115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile  
130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu  
225 230 235 240

s644PCT88.ST25

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe  
245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu  
260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn  
275 280 285

Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys Glu  
290 295 300

Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Lys Ala Lys Ala Glu  
305 310 315 320

Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys Ser  
325 330 335

Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys Thr  
340 345 350

Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Ser Thr Asn Asn Arg Ala  
355 360 365

Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser  
370 375 380

Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu  
385 390 395 400

Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile  
405 410 415

Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp  
420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg  
435 440 445

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala  
450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys  
465 470 475

<210> 52

<211> 418

<212> PRT

<213> artificial sequence

s644PCT88.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hASAP mutant 1-418

&lt;400&gt; 52

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala  
50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys  
85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn  
100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser  
115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile  
130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu  
225 230 235 240

s644PCT88.ST25

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe  
 245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu  
 260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn  
 275 280 285

Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys Glu  
 290 295 300

Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Lys Ala Lys Ala Glu  
 305 310 315 320

Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys Ser  
 325 330 335

Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys Thr  
 340 345 350

Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Ser Thr Asn Asn Arg Ala  
 355 360 365

Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser  
 370 375 380

Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu  
 385 390 395 400

Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile  
 405 410 415

Glu Pro

<210> 53

<211> 303

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> hASAP mutant 1-303

<400> 53

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
 1 5 10 15

s644PCT88.ST25

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala  
50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys  
85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn  
100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser  
115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile  
130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu  
225 230 235 240

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe  
245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu  
260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn  
275 280 285

Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys  
290 295 300